

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Efecto de la exposición a nanopartículas de TiO₂ y ZnO sobre la función del folículo
ovárico y el papel del estrés oxidante”**

Tesis que presenta

M. en C. RAMSÉS ENRIQUE SANTACRUZ MÁRQUEZ

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

En la especialidad de Toxicología

Directora de tesis:

Dra. María Isabel Hernández Ochoa

Ciudad de México, febrero del 2021

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Toxicología Reproductiva Femenina del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la dirección de la Dra. María Isabel Hernández Ochoa. Este trabajo de tesis se financió a través del Fondo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Cinvestav (Fondo Sep-Cinvestav) a través del proyecto No. 189 otorgado a M.I.H.O., y también por medio de la beca de doctorado No. 300476 otorgada a Ramsés Enrique Santacruz Márquez.

RESUMEN

Las nanopartículas (NP) de dióxido de titanio (TiO₂) y óxido de zinc (ZnO) son NP metálicas que encabezan la lista de mayor producción y uso, principalmente en la industria cosmética. El ovario está compuesto fundamentalmente de unidades estructurales y funcionales conocidas como folículos. Los folículos antrales tienen la función de sintetizar hormonas esteroideas y promover la maduración del ovocito hasta ser liberado para ser fertilizado. Estudios previos han descrito que las NP de TiO₂ y ZnO pueden causar efectos adversos sobre la función ovárica, sin profundizar sobre la interacción directa con células foliculares y sus potenciales efectos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las NP de TiO₂ y ZnO sobre la funcionalidad del folículo antral ovárico y si se relaciona con la generación de estrés oxidante. Cultivos primarios de folículos antrales ováricos de ratón se expusieron a 5, 10, 15, 25 y 50 µg/mL de NP de TiO₂ o de ZnO por 96 h en una suspensión estable para evaluar el ingreso y distribución en el folículo, así como su efecto sobre la actividad metabólica, diámetro, morfología y capacidad esteroidogénica. Los resultados muestran que las NP de TiO₂ ingresan y se distribuyen a las distintas estirpes celulares del folículo (granulosa, teca y cúmula), mientras que las NP de ZnO se disuelven en el medio de cultivo, posiblemente ingresando como ion y como NP al folículo. Interesantemente, aunque no se observó presencia de NP en el ovocito, sí se observó alteración de las estructuras de comunicación con las células de la cúmula, así como de la ultra-estructura de las mitocondrias de las células del folículo antral, sugiriendo un daño en la calidad del ovocito. Las NP de TiO₂ aumentaron el diámetro del folículo antral, posiblemente debido a la desorganización del citoesqueleto y la morfología folicular. La co-exposición de NP de TiO₂ y 100 µM de trolox (Tx: agente antioxidante) previno el aumento en el diámetro folicular que se había observado por la exposición a las NP de TiO₂. Por otro lado, la exposición a las NP de ZnO también afectó la morfología folicular, efecto que no se revierte con la co-exposición con Tx, sino que induce una disminución en el crecimiento del folículo antral. Se observaron alteraciones en el arreglo del citoesqueleto en las células de la teca de los folículos expuestos a ambas NP. Finalmente, se observó que ambas NP afectaron la producción de hormonas de distinta manera. Por un lado, las NP de TiO₂ tuvieron efectos diferenciados que pueden deberse al estado de aglomeración/agregación y a su potencial como disruptor endocrino, favoreciendo la acumulación de andrógenos y disminución en los niveles de mRNA de receptores como *Lhcgr* y *ER1* a una concentración (50 µg/mL), mientras que a otra concentración indujo apoptosis (25 µg/mL). Por otro lado, las NP de ZnO también tuvieron un efecto diferente dependiendo de la concentración empleada. La concentración más baja (5 µg/mL) promovió la síntesis de estradiol mediante el incremento en la expresión de *Cyp19a1* y disminución del mRNA del *Cyp11b1* (que participa en la degradación del estradiol), mientras que la concentración más alta (15 µg/mL) sólo tuvo efecto sobre la respuesta antioxidante. Al analizar la generación de ROS como mecanismo de toxicidad, observamos que éstas podrían participar en las alteraciones morfológicas (evidenciado por la protección del antioxidante Tx para NP de TiO₂) y que las NP de ZnO pueden favorecer su formación, ya que se observó una inducción de la respuesta antioxidante y disminución en los niveles de ROS (en la concentración más alta). Sin embargo, estos resultados no son concluyentes para determinar si las ROS participan directamente en los efectos observados o si se forman durante el daño inducido. En conjunto, estos resultados muestran que ambas NP alteraron la funcionalidad del folículo por medio de mecanismos distintos de toxicidad debido a la capacidad de disociación de las NP de ZnO y al ingreso y aglomeración de las NP de TiO₂. Igualmente, estos resultados resaltan la importancia de realizar estudios de toxicidad reproductiva femenina de la exposición a las NP, los cuales consideren variables como el tamaño, estado de aglomeración/agregación, disolución, e ingreso celular, entre otros.

ABSTRACT

Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles (TiO₂ and ZnO NP) are metallic NP heading the list of highly produced nanomaterials and mainly used in the cosmetics industry. The ovary is comprised of structural and functional units known as follicles. Antral follicles are responsible for synthesizing steroid hormones, and for promoting oocyte maturation which enables the female gamete to be fertilized. Previous studies have shown that these NP may impair ovarian function, but no studies have assessed whether NP directly interact with follicular cells nor whether they induce toxicity on these cells. The aim of this study was to evaluate the potential effects of TiO₂ and ZnO NP on ovarian antral follicle function and to determine whether these effects relate to oxidative stress induction. Primary cultures from mouse antral follicles were exposed to 5, 10, 15, 25, and 50 µg/mL of TiO₂ or ZnO NP for 96 h to evaluate the uptake and/or distribution as well as their effect on antral follicle metabolic activity, diameter, morphology, and steroidogenic capacity. Our results showed that TiO₂ NP internalized and distributed to different follicular cell types (theca, granulosa and cumulus cells). On the other hand, ZnO NP dissolved in culture media, and possibly were internalized in the form of either NP or ions. Interestingly, although there was no presence of NP in the oocyte, alterations in the female gamete were found as evidenced by the loose of communicating structures (transzonal projections) between the oocyte and their surrounding cumulus cells. Further, ultrastructural alterations in theca cells mitochondrion were found. TiO₂ NP exposure increased antral follicle diameters, potentially due to cytoskeletal disorganization in follicular cells and follicular morphology alterations. TiO₂ and trolox antioxidant (Tx) co-exposure prevented the increased follicular diameter induced by TiO₂ NP alone. On the other hand, ZnO NP also affected follicular morphology, effect that was not prevented with the co-exposure to trolox, in fact, a decrease in the follicular diameter was observed. Alterations in the cytoskeletal dynamics were found in theca cells from exposed antral follicles to both NP. Finally, both NP affected steroid hormones production in a different manner. On one hand, TiO₂ NP exposure had different effects that may be due to NP agglomeration/aggregation and to their potential mechanism as endocrine disruptors, promoting androgens accumulation as well as a decrease in Lhcgr and ER1 receptors mRNA levels at one concentration (50 µg/mL), while apoptosis induction was observed at another concentration (25 µg/mL). On the other hand, ZnO NP also had differentiated effects at low or high concentrations. The lower concentration (5 µg/mL) promoted estradiol synthesis through an increased *Cyp19a1* mRNA levels and a decreased *Cyp11b1* (involved in estradiol breakdown) mRNA level, whereas the higher concentration (15 µg/mL) had an effect on the antioxidant response in antral follicles. When ROS generation was analyzed as a possible mechanism of toxicity, we concluded that this might participate in the morphological alterations (evidenced by the protective effect of trolox in TiO₂ NP effects) and that ZnO NP may promote ROS formation as evidenced by the antioxidant response at the high concentration. However, more studies are warranted to better assess a direct participation of ROS in the observed effects, and to investigate if they are formed as a consequence of damage. Together, our findings show that both NP affected antral follicle function through different mechanisms of toxicity due to the dissociation ability of ZnO NP and uptake and agglomeration/aggregation effects of TiO₂ NP. Our findings highlight the importance of female reproductive toxicity studies of NP taking into account their physicochemical characteristics such as size, agglomeration/aggregation, dissolution, and uptake pathway, among others.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Isabel Hernández Ochoa, por su valioso apoyo y por dirigirme en este proyecto. Gracias por sus sugerencias, por sus comentarios, por su tiempo, y por permitirme trabajar y desarrollar este trabajo. Gracias por aceptarme en su laboratorio y por todo lo que aprendí de usted como profesional y como persona. Me llevo una muy grata experiencia durante este tiempo en su laboratorio.

A la Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz por sus comentarios y sugerencias, como parte de mi comité académico, para mejorar el proyecto. Muchas gracias también por su apoyo y disposición para compartir sus conocimientos e instruirme en el área de la nanotoxicología.

A los Dres. Ma. Betzabet Quintanilla Vega, Alonso Fernández Guasti y Rodrigo Franco Cruz por formar parte de mi comité académico y por sus importantes comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer el trabajo. Gracias por su tiempo y su apoyo.

A la Dra. Jodi Flaws de la Universidad de Illinois por recibirme en su laboratorio para la realización de mi estancia académica. Gracias por los aprendizajes y por su calidez humana.

A la Dra. Sihomara Patricia García Zepeda por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto, pero sobre todo por su amistad y por los agradables momentos que pasamos.

A la QFB Sirenia González Posos, del LaNSE-CINVESTAV por su apoyo técnico, paciencia e instrucción en el procesamiento de muestras para TEM. Me llevo una grata experiencia del tiempo que trabajé a su lado, pero sobre todo me llevo una bonita amistad.

Al Dr. Jaime Santoyo del Departamento de Física del CINVESTAV por el apoyo en el análisis de las características fisicoquímicas de las NP empleadas en este trabajo.

Al Dr. Jaime Roque de la Fuente del LANE-CINVESTAV por su apoyo para la caracterización mediante SEM de las NP empleadas en este trabajo.

Al personal de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV (UPEAL), la C. Irma Zavala Mejía por el apoyo en la solicitud de animales de laboratorio. A los MVZ Ricardo Gaxiola Centeno, Rafael Leyva Muñoz y Benjamín Emmanuel Chávez Álvarez por su apoyo en el manejo y cuidados de los animales en el bioterio.

A Patricia Cabrera Mata y a Lucina González de la Torre por el apoyo secretarial.

A los integrantes actuales y egresados del laboratorio 29 por el compañerismo, el apoyo y la amistad, por los festejos de cumpleaños y de fin de año. Gracias Elim, Arlet, Gaby, Deyanira, Cristian, Marijose, Teresita, Brenda y Laura.

Gracias a Andrea, Irnzen, Julia y Citlalin por el apoyo durante su servicio social.

A los integrantes del laboratorio de la Dra. Flaws por su apoyo y amistad. Gracias a Liying, Daryl, Katie, Saniya, Viki, Andressa, Yuna, Alison, Genoa y Jessica.

A la Dra. Aidee Solorio y al Dr. Vicente Escamilla por su apoyo.

A mi familia y amigos por apoyarme todo este tiempo, por darme tanta felicidad y momentos que atesoro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado

Tabla de contenido

	Página
1	Introducción..... 1
1.1	Nanotecnología 1
1.1.1	Nanopartículas 1
1.2	Nanotoxicología..... 8
1.2.1	Interacciones de las NP con las células 9
1.2.2	Mecanismos de toxicidad de las NP 10
1.2.3	Toxicidad de las NP de TiO ₂ y ZnO mediada por ROS 13
1.3	Función ovárica..... 14
1.3.1	Foliculogénesis 14
1.3.2	Esteroidogénesis 18
1.4	Efectos de las NP en el aparato reproductor 19
1.4.1	Reprotoxicidad de las NP de dióxido de titanio 20
1.4.2	Reprotoxicidad de las NP de zinc 21
1.5	Justificación 23
1.6	Hipótesis 25
1.7	Objetivos 25
1.7.1	Objetivo general 25
1.7.2	Objetivos específicos 25
2	Métodos 27
2.1	Diseño experimental 27
2.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) 28
2.2.1	Principio 28
2.2.2	Procedimiento..... 29
2.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM)..... 29
2.3.1	Principio 29
2.3.2	Procedimiento..... 29
2.4	Espectroscopía de rayos X..... 30
2.4.1	Principio 30
2.4.2	Procedimiento..... 30

2.5	Difracción de rayos X	31
2.5.1	Principio	31
2.5.2	Procedimiento.....	31
2.6	Dispersión de las NP.....	31
2.6.1	Principio	31
2.7	Dispersión dinámica de la luz.....	32
2.7.1	Principio	32
2.7.2	Procedimiento.....	33
2.8	Electroforesis de Laser tipo Doppler (LDE).....	33
2.8.1	Principio	33
2.8.2	Procedimiento.....	34
2.9	Modelo animal	34
2.10	Cultivo primario de folículos antrales y exposición a NP.....	34
2.11	Ensayo de metabolismo celular mediante reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.....	36
2.11.1	Principio	36
2.11.2	Procedimiento.....	36
2.12	Microscopía electrónica de transmisión para análisis de internalización	37
2.12.1	Principio	37
2.12.2	Procedimiento.....	37
2.13	Inmunofluorescencia de las células del folículo	39
2.13.1	Principio	39
2.13.2	Procedimiento.....	39
2.14	Determinación de radicales libres totales.....	40
2.14.1	Principio	40
2.14.2	Procedimiento.....	40
2.15	Cuantificación de niveles hormonales en suero	41
2.15.1	Principio	41
2.15.2	Procedimiento.....	41
2.16	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR)	42
2.16.1	Principio	42

2.16.2	Procedimiento.....	42
2.17	Análisis estadístico.....	45
3	Resultados.....	46
3.1	Caracterización fisicoquímica de las NP	46
3.1.1	Composición elemental de las NP	46
3.1.2	Tamaño primario y morfología de las NP	51
3.1.3	Dispersión de las NP	52
3.1.4	Caracterización fisicoquímica de las NP en el medio de cultivo	53
3.2	Interacción de NP con el folículo antral	55
3.2.1	Actividad metabólica.....	55
3.2.2	Efecto de las NP sobre el diámetro folicular	57
3.2.3	Papel del trolox sobre el efecto de las NP en el diámetro y morfología folicular	58
3.2.4	Efecto de las NP sobre el arreglo del citoesqueleto.....	64
3.2.5	Internalización y localización de las NP en el folículo antral	67
3.2.6	Disociación de las NP de ZnO en el medio de cultivo	70
3.2.7	Efecto de las NP sobre la ultraestructura del folículo antral	72
3.3	Efecto de las NP de TiO ₂ sobre reguladores de apoptosis y del ciclo celular	74
3.4	Efecto de las NP de TiO ₂ sobre la capacidad esteroidogénica del folículo antral	77
3.4.1	Efecto de las NP sobre los niveles de hormonas esteroideas	77
3.4.2	Efecto de las NP sobre la expresión de genes de la vía esteroidogénica.....	78
3.4.3	Efecto de las NP sobre la expresión de receptores de hormonas esteroideas gonadotropinas	80
3.5	Efecto de las NP de TiO ₂ sobre el estrés oxidante.....	82
3.6	Efecto de las NP de ZnO sobre reguladores de apoptosis y del ciclo celular	85
3.7	Efecto de las NP de ZnO sobre la capacidad esteroidogénica del folículo antral..	87
3.7.1	Efecto de las NP sobre los niveles de hormonas esteroideas	88
3.7.2	Efecto de las NP sobre la expresión de genes de la vía esteroidogénica.....	89
3.7.3	Efecto de las NP sobre la expresión de receptores de hormonas esteroideas gonadotropinas	91
3.8	Efecto de las NP de ZnO sobre el estrés oxidante	92
4	Discusión	95

4.1	Resumen de efectos	95
4.2	Citotoxicidad de las NP sobre el folículo antral	96
4.3	Interacción NP-folículo antral.....	98
4.4	NP de TiO ₂ y la esteroidogénesis.....	104
4.5	NP de ZnO y la esteroidogénesis	108
4.6	NP y estrés oxidante	111
5	Conclusiones.....	117
6	Perspectivas	118
7	Bibliografía.....	119

Índice de figuras

		Página
Figura 1	Tamaño relativo de las nanopartículas.....	2
Figura 2	Posibles mecanismos por los cuales las NP interactúan con sistemas biológicos y generan ROS.....	11
Figura 3	Eventos implicados en el proceso de crecimiento de folículos ováricos.....	17
Figura 4	Esteroidogénesis humana ovárica.....	19
Figura 5	Diseño experimental del estudio.....	27
Figura 6	Diseño experimental del cultivo <i>in vitro</i> del folículo antral.....	28
Figura 7	Espectro de espectroscopía de rayos X (EDS) por energía dispersiva... ..	47
Figura 8	Patrón de difracción de rayos X de las NP de TiO ₂ y de ZnO.....	49
Figura 9	Microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) de las NP de TiO ₂	50
Figura 10	Microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) de las NP de ZnO.....	50
Figura 11	Morfología de las NP de TiO ₂ y ZnO mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM).....	51
Figura 12	Distribución de tamaño de las nanopartículas (NP) de TiO ₂ y ZnO.....	52
Figura 13	Efecto del tiempo de sonicación sobre el tamaño hidrodinámico (DH) y el índice de polidispersión (PDI) de las NP de TiO ₂ y ZnO.....	53
Figura 14	Estabilidad de las suspensiones de nanopartículas en el medio de cultivo.....	54
Figura 15	Efecto de las NP de TiO ₂ y ZnO sobre la viabilidad folicular.....	56
Figura 16	Efecto de las NP de TiO ₂ y ZnO sobre el diámetro folicular.....	58
Figura 17	Efecto del trolox sobre el diámetro folicular.....	59
Figura 18	Efecto del trolox sobre la alteración en el diámetro folicular inducida por las NP de TiO ₂ y de ZnO.....	61
Figura 19	Efecto de la exposición a NP de TiO ₂ y la co-exposición con trolox sobre la morfología folicular.....	62
Figura 20	Efecto de la exposición a NP de ZnO y la co-exposición con trolox sobre la morfología folicular.....	63
Figura 21	Efecto de las NP de TiO ₂ y ZnO sobre la organización del citoesqueleto y papel del trolox.....	66
Figura 22	Análisis de la internalización de NP de TiO ₂ en el folículo antral.....	68
Figura 23	Vías de internalización de NP de TiO ₂ en el folículo antral.....	69
Figura 24	Análisis de la internalización de NP de ZnO al folículo antral.....	70
Figura 25	Disolución de las NP de ZnO en el medio de cultivo.....	72
Figura 26	Análisis de la ultraestructura de folículos antrales expuestos a ambas NP.....	74
Figura 27	Efecto de las NP de TiO ₂ sobre la expresión de enzimas apoptóticas.....	75
Figura 28	Efecto de las NP de TiO ₂ sobre la expresión de enzimas del ciclo celular.....	76

Figura 29	Efecto de la exposición a las NP de TiO ₂ sobre los niveles de hormonas sexuales esteroideas.....	78
Figura 30	Efecto de la exposición a las NP de TiO ₂ sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de estrógenos	79
Figura 31	Efecto de las NP de TiO ₂ sobre la expresión de Cyp1b1.....	80
Figura 32	Efecto de las NP de TiO ₂ sobre la expresión de receptores celulares.....	81
Figura 33	Efecto de las NP de TiO ₂ sobre la expresión de enzimas antioxidantes...	83
Figura 34	Efecto de las NP de TiO ₂ en los niveles de ROS/RNS en el folículo antral a través del tiempo.....	84
Figura 35	Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de enzimas apoptóticas.....	86
Figura 36	Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular y de Ki67.....	87
Figura 37	Efecto de las NP de ZnO sobre los niveles de hormonas sexuales esteroideas.....	88
Figura 38	Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de estrógenos.....	89
Figura 39	Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de Cyp1b1.....	90
Figura 40	Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de receptores celulares....	92
Figura 41	Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de enzimas antioxidantes...	93
Figura 42	Efecto de las NP de ZnO en los niveles de ROS/RNS en el folículo antral a través del tiempo.....	94
Figura 43	Efectos inducidos por las NP de TiO ₂ y ZnO en el estudio exploratorio.	103

Índice de tablas

		Página
Tabla 1	Procedimiento de deshidratación de las muestras	38
Tabla 2	Secuencias de los oligos para las reacciones de qPCR	44
Tabla 3	Composición elemental de las NP de TiO ₂ y ZnO	47

Abreviaturas

NP	Nanopartículas
TiO ₂	Dióxido de Titanio
ZnO	Óxido de Zinc
FSH	Hormona Foliculoestimulante
LH	Hormona Luteinizante
CG	Células de la Granulosa
LHR	Receptor a Hormona Luteinizante
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotrofinas
E ₂	Estradiol
COC	Complejo Ovocito Células de la cumula
CC	Células de la Cumula
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
EDS	Energía Dispersiva de Rayos X
XRD	Difracción de Rayos X
DH	Diámetro Hidrodinámico
PDI	Índice de Polidispersión
ζ	Potencial Z
DLS	Dispersión Dinámica de luz
LDE	Electroforesis de Laser Tipo Doppler
SFB	Suero Fetal Bovino
ITS	Insulina, Transferrina, Selenio
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina
PBS	Buffer fosfato salino
HRTEM	Microscopía Electrónica de Alta Resolución
Tx	Trolox
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ER1	Receptor de Estrógenos alfa
AR	Receptor de Andrógenos

1 Introducción

1.1 Nanotecnología

De acuerdo con la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos (NNI, por sus siglas en inglés: **n**ational **n**anotechnology **i**nitiative), la nanotecnología es la ciencia, ingeniería y tecnología llevada a cabo a nanoescala. Es decir, alrededor de 1-100 nanómetros (nm). La nanociencia es el estudio y aplicación de objetos extremadamente pequeños que puede ser usada en muchas otras áreas de la ciencia como la química, biología, física, ciencia de materiales e ingeniería (*What It Is and How It Works* / *nano.gov*, s. f.). Se han realizado grandes avances en nanotecnología gracias a un esfuerzo importante en investigación desde principios del siglo XXI, con el propósito de aprovechar las propiedades de los conjuntos de átomos y moléculas a escala nanométrica. La habilidad de manipular las propiedades físicas, químicas y biológicas de estas partículas brinda a los investigadores la capacidad de diseñar y usar nanopartículas (NP) con distintos fines que incluyen la liberación de fármacos, su uso como agentes contrastantes de imágenes para propósitos de diagnóstico, para mejorar las características organolépticas de algunos alimentos y brindar propiedades antimicrobianas, entre otras (Horie *et cols.*, 2012; McNeil, 2005).

1.1.1 Nanopartículas

Considerando la definición de nanotecnología, las NP son materiales que tienen al menos una de sus dimensiones por debajo de los 100 nm. Estas NP tienen un conjunto de propiedades que las distinguen de los materiales macrométricos en virtud de su tamaño, como la reactividad química, energía de absorción y movilidad biológica, entre otros (Murthy,

2007). Además, las NP presentan mayor actividad física y química por unidad de peso, lo que explica el amplio uso que éstas tienen actualmente en distintos campos y aplicaciones (Horie y cols., 2012). Las NP son más pequeñas que las células humanas (10000-20000 nm) e incluso, que los organelos celulares y son similares en tamaño a grandes macromoléculas biológicas como enzimas y receptores; por ejemplo, la hemoglobina tiene alrededor de 5 nm de diámetro, mientras que la bicapa lipídica tiene unos 6 nm de grosor (McNeil, 2005) (figura 1).

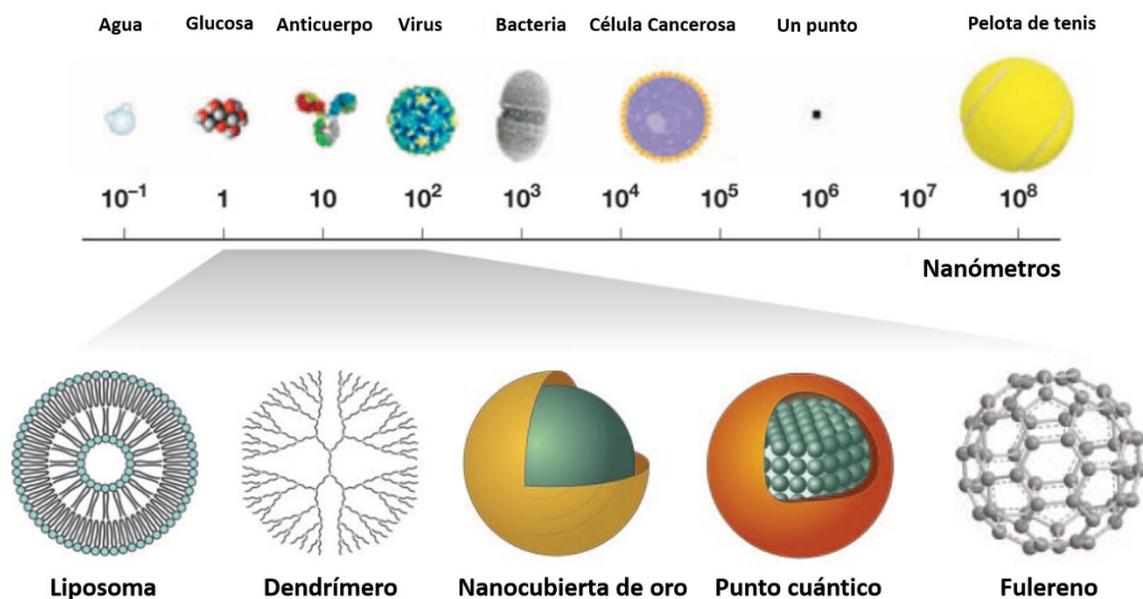


Figura 1. Tamaño relativo de las nanopartículas. Tamaño relativo de NP comparado con moléculas, entidades biológicas y artículos de uso común. Tomada y traducida de McNeil (2005).

Se han sintetizado diferentes tipos de NP que incluyen una variedad de tamaños y formas, así como materiales que confieren propiedades químicas y de superficie específicas. El campo de la nanotecnología sigue en rápido crecimiento y consecuentemente también el desarrollo y aplicación de las NP, las cuales pueden ser modificadas químicamente por la unión de distintos ligandos que transformen su actividad biológica. La capacidad de

modificar a las NP por unión de ligandos puede convertirlas en biosensores, marcadores fluorescentes, agentes de contraste, o vehículos de liberación de fármacos dirigidos. Lo anterior, facilita el marcaje de células y fármacos, la evaluación de respuestas moleculares a agentes terapéuticos, incluso guiar procedimientos quirúrgicos, entre otras herramientas en el área de la biología (McNeil, 2005).

En particular, las NP de óxidos metálicos poseen características como lo son una alta estabilidad, procesos de preparación relativamente sencillos, ingeniería sencilla para producción de distintos tamaños, formas y porosidad deseada, incorporación a sistemas hidrofóbicos e hidrofílicos y fácil funcionalización con varias moléculas debido a la carga de superficie que las convierte en una herramienta prometedora para diversos usos (Nikolova y Chavali, 2020). Dos NP metálicas de mayor producción a nivel mundial son las NP de dióxido de titanio y óxido de zinc (Piccinno y *cols.*, 2012).

1.1.1.1 NP de dióxido de titanio

El dióxido de titanio (TiO_2) puede encontrarse en la naturaleza en varias formas cristalinas, tales como rutilo, anatasa y brookita. Este compuesto ha sido empleado en muchos productos, normalmente para incrementar la blancura u opacidad de muchos productos de consumo como pinturas, recubrimientos, plásticos, papel, tintas de impresión, alimentos, medicina, pasta dental, cosméticos y productos para el cuidado de la piel (Cargnello y *cols.*, 2014; US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.). Las características propias de las NP de TiO_2 son aprovechadas para ser usadas en el desarrollo de recubrimientos para superficies auto-limpiables, celdas solares, aerosoles desinfectantes, agentes para el tratamiento de agua, en productos alimenticios (como aditivos), en la elaboración de papel,

en cremas solares de uso tópico y en cosméticos, entre otros (Elsaesser y Howard, 2012; US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.).

Algunas NP de TiO_2 poseen actividad fotocatalítica, por lo que son empleadas en el tratamiento de aguas para la degradación de compuestos orgánicos, destrucción de microorganismos, conversión de metales a sus formas menos solubles en aguas residuales, agua de bebida y aire. Por otro lado, las NP de TiO_2 fotoestables son empleadas principalmente en protectores solares (US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.). Además, tienen aplicaciones en productos como pinturas, recubrimientos y cosméticos, en los cuales las propiedades fotocatalíticas del TiO_2 son suprimidas con el uso de recubrimientos en las NP (US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.). Muchos tipos distintos de NP de TiO_2 están disponibles en el mercado y todos poseen propiedades fisicoquímicas distintas como el tamaño, forma, pureza, formas alotrópicas, etc. Estas NP se encuentran disponibles en forma de anatasa y rutilo puros, o como sus mezclas dependiendo de su uso (Weir y cols., 2012).

En el año 2000, la producción mundial de NP de TiO_2 se estimó en 2000 toneladas, de las cuales el 65% se usó en productos de cuidado personal, mientras que para los años 2006 a 2010 se estimó en 5000 toneladas por año (US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.). La síntesis de NP de TiO_2 se lleva a cabo mediante distintos métodos. La deposición de vapor químico (CVD, por sus siglas en inglés: **chemical vapor deposition**) es una técnica en la cual un sustrato volátil es convertido en uno no volátil que es depositado sobre un sustrato gracias al empleo de plasma, altas temperaturas y presión, entre otras para generar vapor. Se ha reportado el empleo de tetracloruro de titanio (TiCl_4) como sustrato. La hidrólisis en flama es una técnica que puede ser empleada para la deposición de una capa

delgada de NP sobre una superficie, en el cual un gas inerte lleva TiCl_4 hacia una flama que produce cloruro de hidrógeno y una mezcla de TiO_2 de diferentes tamaños (US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.). En ocasiones se emplean métodos adicionales para lograr tamaños menores o para separar aglomerados y agregados, así como el empleo de surfactantes y solventes que pueden ser empleados para mantener el tamaño de las NP (US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.).

La exposición a NP de TiO_2 en seres humanos puede ser por la vía oral, inhalatoria y dérmica. Actualmente, el TiO_2 se emplea ampliamente en la industria alimentaria como aditivo alimentario, comúnmente conocido como E171. Weir y colaboradores (2012) encontraron que el E171 tiene un tamaño promedio de 110 nm y que al menos 36% posee un tamaño menor a 100 nm. Además, evaluaron un amplio espectro de productos alimenticios comerciales para determinar el contenido de titanio y determinaron concentraciones de hasta 340 mg de TiO_2 por ración. En ese trabajo también estimaron el consumo diario de TiO_2 en niños entre 3 y 14 años y encontraron un consumo de hasta 2 mg/kg de peso corporal, del cual hasta 720 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día corresponderían a NP de TiO_2 . Se estima también que la mayoría de los usuarios de protectores solares emplean concentraciones de 0.5-1.5 mg/cm^2 de NP de TiO_2 (Srinivas y cols., 2006). Asumiendo lo anterior, en un día de exposición solar, un adulto podría aplicarse entre 10 y 46 g de bloqueador por aplicación, y considerando que los bloqueadores contienen 2-15% de NP de TiO_2 , una persona podría aplicarse diariamente de 0.5 a 2.3 g de estas NP (US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.). La exposición por vía inhalatoria representa un menor riesgo para una persona, sin embargo, podría estar expuesta a las NP de TiO_2 por inhalación de vapores durante el baño o en ambientes humedecidos con nebulizadores y además por el uso de

protectores solares en aerosol (US EPA National Center for Environmental Assessment, s. f.), sin embargo, existen pocos estudios al respecto.

1.1.1.2 NP de óxido de zinc

Las NP de ZnO poseen una estructura cristalina que contribuye a sus propiedades optoelectrónicas (Wang, 2004), transparencia que favorece su uso en recubrimientos o superficies transparentes, así como piezoelectricidad, que las hace especialmente interesantes para su uso en sensores electrónicos, celdas solares y transductores (Ma y cols., 2013). Debido a sus propiedades fotocatalíticas se emplean en tecnología de remediación ambiental, así como en desinfección médica (Hoffmann y cols., 2009). Estas NP también se emplean en productos como plásticos, pinturas, pigmentos, así como alimentos (como fuente de Zn), baterías y retardantes de flama, entre otros. Sin embargo, su uso no se limita a éstos, ya que algunos productos de uso personal como cosméticos y cremas también contienen NP de ZnO debido a sus propiedades para absorber luz UV y a sus propiedades reflexivas (Hsueh y cols., 2015; Ma y cols., 2013; Nohynek y Dufour, 2012). Recientemente, se ha observado que las NP de ZnO tienen un alto grado de selectividad por las células cancerosas, superando los índices de algunos agentes quimioterapéuticos normalmente usados (Bedi y Kaur, 2015). La nanotecnología aplicada a la agricultura es otro uso importante debido a que se ha observado que fertilizantes nano-encapsulados de liberación lenta minimizan el consumo de fertilizante y la contaminación ambiental. Además, estas NP *per se* tienen usos como fertilizantes, y aunque algunos estudios han mostrado que tienen la capacidad de incrementar el crecimiento y rendimiento de cultivos alimentarios (Sabir y cols., 2014), otros estudios han encontrado que estas NP pueden tener efectos fitotóxicos y afectar el crecimiento de plantas, lo que se ha relacionado con el tamaño nanométrico (Yang y cols., 2015). El amplio espectro de usos

que tienen actualmente ha conducido a un incremento en la exposición humana a estas NP y por lo tanto, a un incremento potencial en el riesgo, por lo que surge la necesidad de estudiar los efectos tóxicos de estas NP.

Las NP de ZnO son un polvo blanco opaco que puede ser sintetizado a partir de distintos métodos físicos, químicos y hasta por métodos amigables con el ambiente. La síntesis química es una de las más importantes y puede llevarse a cabo mediante el uso de precursores químicos y bajo distintas condiciones de temperatura, tiempo o concentración de reactivos, que conllevan a variaciones en el tamaño y geometría de las NP que se generan (Sabir y cols., 2014). Entre estos métodos destaca la síntesis por transporte de vapor, que es uno de los métodos más empleados. En este proceso se generan vapores de zinc y oxígeno que reaccionan entre sí para formar a las NP. Sin embargo, una de las desventajas de los métodos químicos es que pueden producirse moléculas de otra naturaleza química que pueden adsorberse a las NP (Sabir y cols., 2014). La síntesis verde involucra técnicas que emplean solventes amigables con el ambiente como extractos naturales y el uso de microorganismos y plantas para sintetizar estas NP. Sin embargo, estos métodos presentan la dificultad de involucrar procesos muy elaborados para mantener a los microorganismos, para lograr la síntesis y sobre todo involucra muchos pasos intermedios para la purificación (Sabir y cols., 2014).

Una revisión realizada en 2014 muestra distintos parámetros farmacocinéticos y cómo es que estos se pueden modificar dependiendo de las características de las NP de ZnO. Luego de una administración única por vía oral a ratas macho, la concentración máxima de Zn en plasma se alcanza a distintos tiempos dependiendo de la dosis administrada (1, 6 y 24 h para 50, 200 y 2000 mg/kg) de NP de ZnO (20 nm). Partículas negativamente cargadas se

absorben mejor que aquellas con carga positiva por lo que, en este estudio, los autores concluyen que la carga, más que el tamaño, son un factor dominante en la eficiencia de absorción. Los órganos a los que estas NP se distribuyen principalmente son pulmón, hígado y riñón y se ha descrito que la eliminación se lleva a cabo por vía urinaria para NP con un tamaño hidrodinámico menor a 5 nm mientras que NP de mayor tamaño son eliminadas principalmente por vía fecal (Choi y Choy, 2014).

1.2 Nanotoxicología

La amplia gama de usos de las NP tanto en ciencia básica como en la industria ha favorecido la exposición de poblaciones humanas, por lo que resulta de suma importancia evaluar su potencial toxicológico. A pesar de que el campo de la toxicología considera aspectos físicos y químicos en la evaluación toxicológica, el estudio de las NP implica otro tipo de consideraciones. El tamaño de la NP, forma, dispersión, composición, propiedades de superficie, entre otras características pueden potencialmente influir la toxicidad en formas que hasta ahora son desconocidas. Para generar resultados reproducibles es necesario que los materiales de prueba sean adecuadamente descritos respecto a las propiedades relevantes (Powers y cols., 2009).

Considerando lo anterior, el estudio toxicológico de las NP representa un reto importante en la actualidad. De acuerdo con una editorial de Nature Nanotechnology, la caracterización de nanomateriales debe hacerse con base en la relevancia para el estudio, sin embargo, existe un número de parámetros que deben ser incluidos en todos los trabajos, algunos son: tamaño de partícula y distribución, composición química, impurezas, grado de agregación o aglomeración, superficie de área y morfología («Join the Dialogue», 2012), puesto que estos

parámetros pueden influir en la comprensión sobre el mecanismo mediante el cual las NP generan toxicidad.

1.2.1 Interacciones de las NP con las células

La interacción NP-célula se refiere a las interacciones que resultan del contacto físico y químico de las NP con las células. La interacción NP-célula juega un papel importante en la liberación de fármacos dirigidos con NP, así como en la nanotoxicología (*Cell-particle interactions - Latest research and news / Nature*, s. f.). La membrana plasmática permite la difusión de pequeñas moléculas no polares como el O₂ y el CO₂, mientras que las moléculas polares, como los iones, y nanomateriales son incapaces de ingresar a las células de este modo. Muchos de estos iones y moléculas son transportados a través de un sistema de canales, mientras que macromoléculas de mayor tamaño son internalizados mediante endocitosis luego de hacer contacto con la membrana celular. La endocitosis es un proceso de internalización que consiste en la formación de vesículas membranales alrededor del “carga” mediante la formación inicial de una invaginación, que después es liberada al citosol formando al endosoma (Verma y Stellacci, 2010). Una vez dentro, el material contenido en los endosomas puede ser liberado a distintos compartimentos intracelulares, ser reciclado al espacio extracelular o enviado a través de las células mediante el proceso de transcitosis en células polarizadas. En general el proceso de endocitosis puede ser dividido en fagocitosis y pinocitosis, la internalización de partículas grandes y de fluidos y solutos, respectivamente (Sahay y cols., 2010).

Las NP pueden ingresar a las células por vías fagocíticas y no fagocíticas, que pueden ser mediadas por proteínas como clatrin, caveolinas o incluso pueden ser independientes a

estas proteínas (Sahay y cols., 2010). La internalización de NP por lo general culmina en la internalización en lisosomas, lo que representa un ambiente hostil que puede ayudar a degradar estos materiales (Stern y cols., 2012). Propiedades fisicoquímicas de las NP como el tamaño, forma, cubierta, carga etc., así como el tipo celular juegan un papel importante en la vía de ingreso de estos nanomateriales a las células, y por lo tanto también pueden influir en su destino, efectos y mecanismos de toxicidad.

1.2.2 Mecanismos de toxicidad de las NP

Debido a las características propias de los materiales nanométricos existe el potencial de efectos tóxicos. Efectos indeseados son posibles debido a diferentes características dadas las interacciones con sistemas biológicos y el ambiente, con el potencial de inducir toxicidad. La mayor superficie de área respecto al volumen de los nanomateriales contribuye a incrementar la reactividad de los mismos, lo que puede resultar en la inducción de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: reactive oxygen species). Otras propiedades fisicoquímicas pueden contribuir favoreciendo determinadas interacciones que pueden incrementar los efectos tóxicos. La disminución en el tamaño del material puede crear planos cristalinos discontinuos que incrementan el número de defectos estructurales, así como la configuración electrónica del material. Lo anterior puede favorecer la formación de sitios en la superficie de los materiales que funcionen como “sitios reactivos”. Algunos grupos en la superficie de los materiales puede volver a los materiales hidrofóbicos o hidrofílicos, o catalíticamente activos o pasivos favoreciendo la interacción de oxígeno molecular con sitios activos donadores o aceptores de electrones que favorecen la formación del anión superóxido (O_2^-) que en conjunto con reacciones tipo Fenton puede favorecer la formación de otras ROS (figura 2). Otras propiedades como la forma, agregación, el

revestimiento y la solubilidad, entre otros, pueden contribuir potenciando o disminuyendo estos efectos (figura 2).

La formación de ROS se ha descrito como uno de los principales mecanismos de toxicidad de las NP ya que se induce estrés oxidante, inflamación y daño a moléculas biológicas como proteínas, membranas y ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés: deoxyribonucleic acid) (Fard y cols., 2015). Sin embargo, otros mecanismos de toxicidad también han sido descritos por la exposición a nanomateriales.

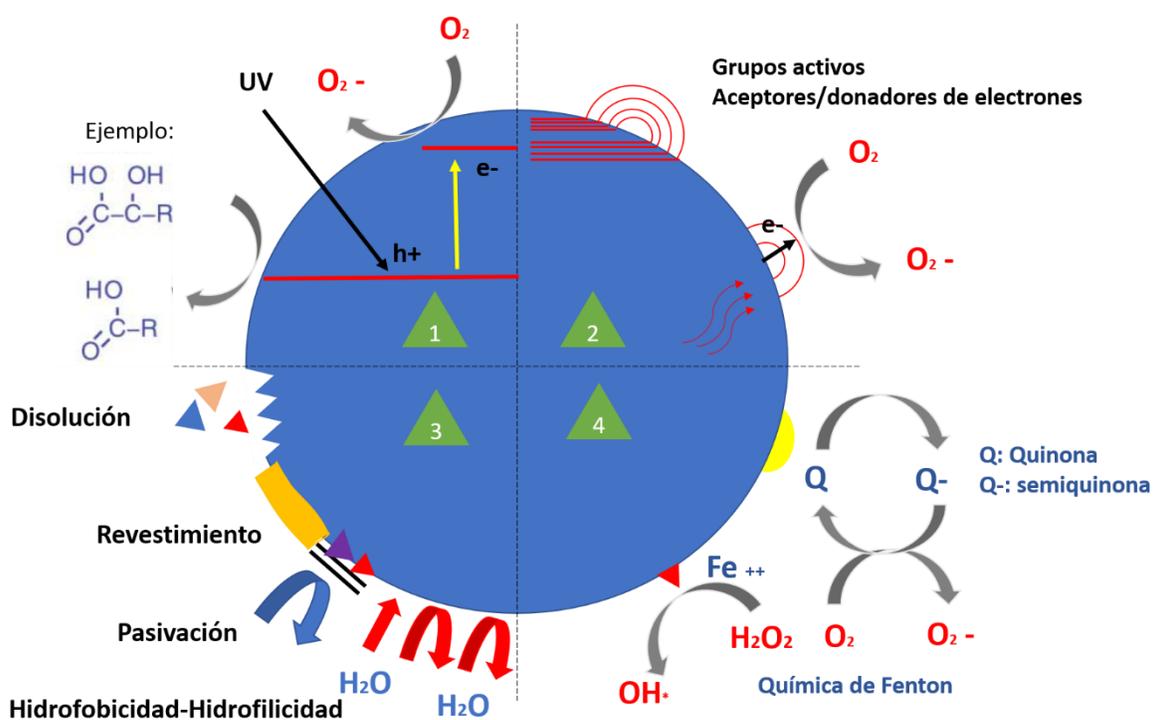


Figura 2. Posibles mecanismos por los cuales las NP interactúan con sistemas biológicos y generan ROS. Los ejemplos ilustran la importancia de la composición del material, estructura electrónica, especies unidas a la superficie y solubilidad, entre otros, así como la contribución de interacciones con otros factores ambientales. 1- Activación de pares de electrones por UV que conduce a ruptura de enlaces y formación de radicales. 2- Composición del material, por ejemplo, planos cristalinos discontinuos y defectos que pueden generar configuraciones electrónicas activas. 3- Interacciones con el medio, disolución de partículas, revestimiento, pasivación, y la hidrofobicidad/hidrofilicidad del material. 4- Química catalítica y ciclos redox vía metales (e.g. Fe) y compuestos orgánicos (e.g. quinonas). Tomada y traducida de McNeil (2005).

1.2.2.1 Generación de especies reactivas de oxígeno

A la variedad de moléculas y radicales libres derivados del oxígeno molecular se les denomina comúnmente como ROS. El O_2^- , producto de la reducción del oxígeno, es el precursor de la mayoría de las ROS y un intermediario en la cadena de transporte de electrones, que al ser dismutado (por la acción de la superóxido dismutasa (SOD)) produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede ser reducido parcial o totalmente al radical hidroxilo o agua, respectivamente. El estrés oxidante se refiere a los procesos deletéreos, resultado de un desbalance entre las ROS formadas y las defensas antioxidantes. El incremento desproporcionado en los niveles basales de estos oxidantes conduce a reacciones en cadena mediadas por radicales libres que tienen como blanco indiscriminado proteínas, lípidos, polisacáridos y DNA (Turrens, 2003). Actualmente se sabe que la mitocondria es una de las principales fuentes de generación de ROS dentro de las células (Murphy, 2009). Dado que el microambiente en este organelo es altamente reductor varios componentes de la cadena respiratoria son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno (Turrens, 2003).

La formación de ROS es uno de los principales mecanismos de toxicidad de las NP que puede provocar estrés oxidante e inflamación y con ello alterar estructuras celulares, incluyendo al DNA (Fard y cols., 2015). Distintas propiedades, como la superficie de área respecto al volumen, de las NP causan una mayor reactividad química, lo que puede resultar en un incremento de ROS (Fard y cols., 2015). El incremento en los niveles de ROS por la exposición a NP involucra principalmente alteraciones en la respiración mitocondrial y la activación de sistemas enzimáticos dependientes de NADPH (Fard y cols., 2015). La exposición a NP puede favorecer la formación de radicales libres o incrementar sus niveles

directa o indirectamente. De acuerdo con la revisión realizada por Fard *y cols.* (2015) existen tres principales vías para la generación de estrés oxidante: Primero, las NP pueden favorecer directamente la generación de estrés oxidante, así como por su habilidad para estimular la generación de ROS como parte de una respuesta celular a estos materiales. La segunda se refiere a la presencia de intermediarios de radicales libres relativamente estables presentes en la superficie de las NP. Finalmente, pueden inducir estrés oxidante mediante la presencia de grupos pro-oxidantes, producto de la funcionalización de NP.

1.2.3 Toxicidad de las NP de TiO₂ y ZnO mediada por ROS

Distintos estudios han descrito que las NP de TiO₂ y ZnO pueden inducir citotoxicidad mediada por ROS en distintos tipos celulares (considerando las distintas vías de ingreso al organismo). Una revisión realizada por Fard *y cols.* (2015) muestra estudios en los que se observó que la citotoxicidad por la exposición a NP de TiO₂ es dependiente del tamaño (a menor tamaño mayor daño), lo que se relaciona con una mayor superficie de área. Zhang *y cols.* (2015), en una reciente revisión encontraron que las NP de TiO₂ pueden inducir estrés oxidante, citotoxicidad y fototoxicidad, afectando distintas funciones celulares y provocando daño al DNA. Por su parte, Jaeger *y cols.* (2012) encontraron que la exposición *in vitro* a NP de TiO₂ generó la formación de ROS en células HaCaT (5 y 50 µg/mL por 4 h), así como daño genotóxico y citotóxico.

Por otro lado, Abbasalipourkabir *y cols.* (2015) encontraron que la exposición *in vivo* a NP de ZnO (10-30 nm) incrementa el índice de lipoperoxidación en ratas macho a partir de 150 mg/kg por día por una administración vía *i.p.* sin alterar la actividad de las enzimas SOD y glutatión peroxidasa (GPX). Otro estudio encontró que la exposición a NP de ZnO suprimió

la actividad antioxidante del hígado de manera dependiente de la concentración (100-600 mg/kg) luego de que ratas macho fueron expuestas a las NP a través del alimento, y que esto afectó además otros parámetros como la actividad de citocromos tanto en hígado como en intestino (Tang y cols., 2016).

1.3 Función ovárica

Los ovarios se localizan a los lados del útero en la cavidad pélvica y son responsables de producir a las unidades funcionales, los folículos ováricos, que consisten en un ovocito rodeado de células de la granulosa (CG) delimitados por una capa de células de la teca, mediante dos procesos estrechamente relacionados; la ovogénesis y la foliculogénesis (Hirshfield, 1991). Gracias a estos dos procesos, el ovario cumple con dos roles fisiológicos de gran importancia. Por un lado, es capaz de generar y liberar un ovocito maduro con la capacidad de ser fertilizado y por el otro lado, es capaz de sintetizar y secretar hormonas esenciales para mantener las funciones normales en el tracto reproductivo (Barnett y cols., 2006).

1.3.1 Foliculogénesis

Desde la embriogénesis, las células germinales primordiales u “oogonias” son alojadas en el ovario en desarrollo junto con células somáticas, donde ambos tipos celulares se dividen por mitosis, incrementando así su número para después diferenciarse formando los folículos primordiales. Después del nacimiento, se establece un número finito de folículos primordiales, esenciales para la fertilidad en la vida adulta (Hernández-Ochoa y cols., 2018). Dentro de estos folículos, los ovocitos permanecen arrestados en la profase I de la primera división meiótica hasta que son activados (LaBarbera, 2010), lo que inicia el crecimiento y

diferenciación celular dentro del folículo, que pasa por distintas etapas que incluyen al folículo primario, preantral, antral y ovulatorio (Hernández-Ochoa y cols., 2018).

Distintos factores dependientes e independientes de hormonas promueven el crecimiento de los folículos. Estímulos dentro del ovario promueven el reclutamiento inicial, que consiste en la estimulación de algunos folículos primordiales para que inicien su crecimiento mientras que el resto de estos folículos permanecen quiescentes por meses o años (McGee y Hsueh, 2000). El reclutamiento cíclico, dependiente de hormonas, resulta luego del incremento en los niveles circulantes de hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés: **follicle stimulating hormone**) en cada ciclo reproductivo, con lo cual se rescata una cohorte de folículos antrales para que continúen su crecimiento, mientras que el resto van a atresia (muerte celular) (McGee y Hsueh, 2000). La transición desde folículo primordial hasta folículo preantral implica importantes cambios estructurales y es regulada por una red de señales. Cambios en la morfología de las CG, que pasan de forma alargada a cuboidal, incremento de la actividad mitótica en las CG, aparición de la zona pelúcida alrededor del ovocito, así como un incremento en el tamaño del ovocito, son características de la transición desde folículo primordial a folículo primario (Hernández-Ochoa y cols., 2018). La transición a folículo preantral implica el incremento del número de CG y la formación de múltiples capas en el folículo, crecimiento del ovocito, la aparición de una capa de células de la teca (teca interna y teca externa) delimitando el folículo, así como la vascularización del mismo (Hernández-Ochoa y cols., 2018).

La formación del folículo antral tiene como característica principal la aparición de un espacio lleno de líquido (ultra-filtrado del suero que contiene hormonas como FSH, luteinizante (LH, por sus siglas en inglés: **luteinizing hormone**), estrógenos y andrógenos entre otros)

denominado “antro”. La LH, liberada de la pituitaria anterior bajo el control pulsátil de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH, por sus siglas en inglés: **gonadotropin-releasing hormone**) proveniente del hipotálamo, se une a su receptor (LHR, por sus siglas en inglés: **luteinizing hormone receptor**) en las células de la teca y estas en respuesta producen testosterona (Lee y Rhee, 2007). Después, la FSH se une a su receptor en las CG, incrementando la expresión de la aromatasa, hormona que convierte la testosterona en estradiol (E₂) (Hernández-Ochoa y cols., 2018). Este compuesto estimula el crecimiento del folículo hasta la fase preovulatoria. En esta fase, las CG se diferencian en dos linajes anatómica y funcionalmente distintos: las células murales, en la periferia del folículo y las células de la cumula (CC), que se encuentran en íntima asociación con el ovocito por medio de uniones gap, formando el complejo ovocito-células de la cumula (COC) (Gilchrist y cols., 2008). Finalmente, un pico o descarga de LH que incide sobre el folículo interrumpe sustancialmente la comunicación entre las CC, lo que se ha relacionado con la reanudación y progresión de la meiosis de profase I a metafase II, la expansión de las CC alrededor del ovocito y el inicio de la ovulación (Dekel y cols., 1981; Dekel, 2005; Granot y Dekel, 2002). El proceso de foliculogénesis se resume en la figura 3.

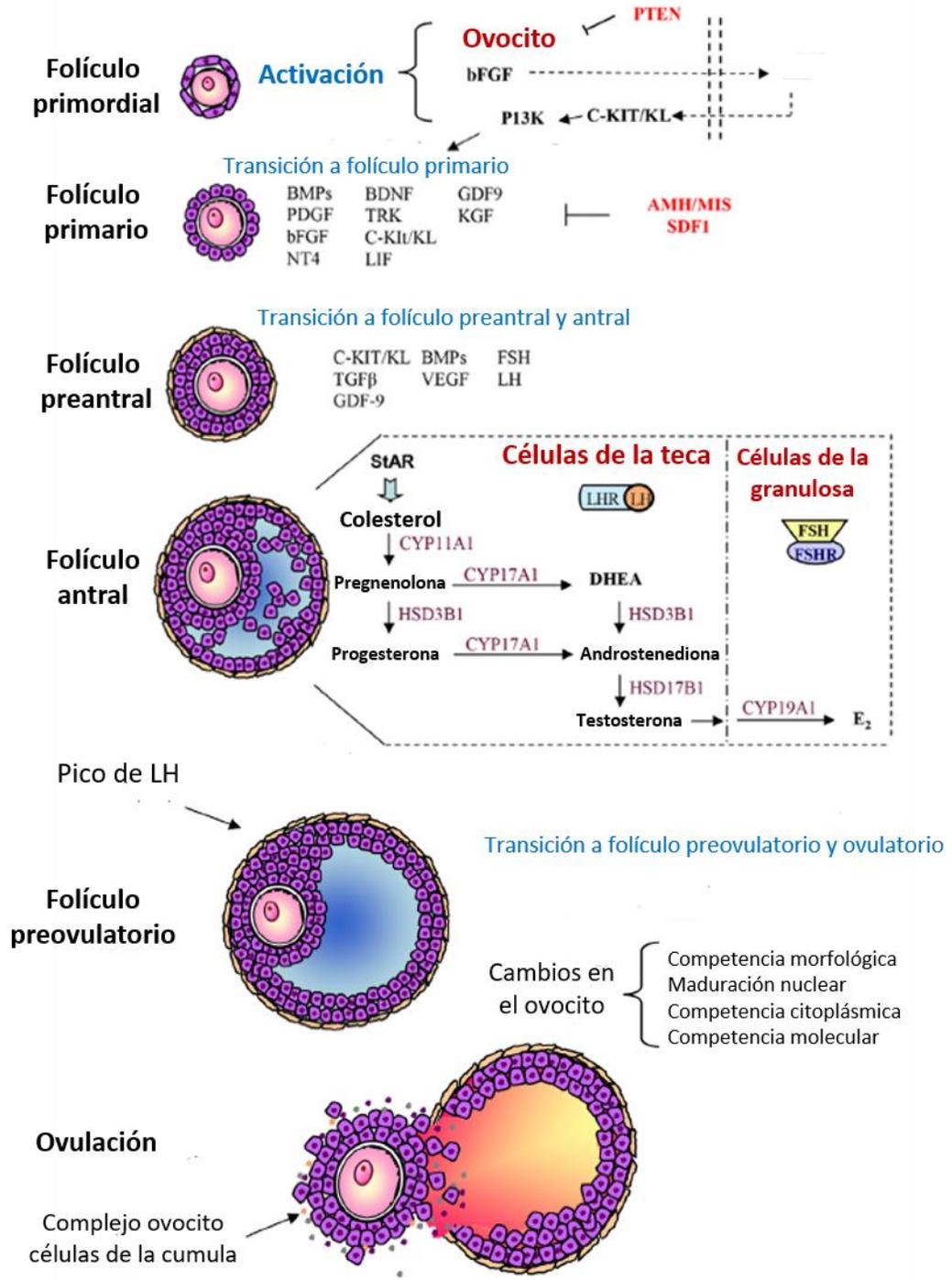


Figura 3. Eventos implicados en el proceso de crecimiento de folículos ováricos. El proceso de foliculogénesis comienza con la aparición de un conjunto finito de folículos primarios. Durante la edad reproductiva femenina, los folículos primordiales son activados para crecer por factores secretados por el ovocito como bFGF. BFGF incluye la expresión de KL en las células de la granulosa, que se une a su receptor en la superficie del ovocito C-KIT. Esta unión desencadena la cascada de señalización de PI3K en el ovocito, que conduce al crecimiento del ovocito. La activación de los folículos primordiales es negativamente regulada por PTEN. Una vez activado, muchos genes regulan la transición del folículo primordial a primario. Esta

transición es negativamente regulada por factores como AMH/MIS y SDF-1. La transición del folículo primario a preantral involucra la proliferación de las células de la granulosa y la aparición de células de la teca en la periferia. El folículo antral adquiere la capacidad de convertir colesterol en testosterona y estradiol. El estradiol producido estimula el crecimiento del folículo antral para llegar al folículo preovulatorio, que recibe el estímulo de un pico de LH que induce la maduración y competencia del ovocito. Después de 14-16 h después del estímulo de LH, el complejo ovocito células de la cumula es liberado del folículo, proceso conocido como ovulación. Tomada y traducida de Hernández-Ochoa y cols. (2018).

1.3.2 Esteroidogénesis

Distintas moléculas participan en la síntesis de estrógenos en el folículo, cuya expresión es estrictamente regulada. Primeramente, el colesterol es transportado a la mitocondria de las células de la teca gracias a la acción de la proteína StAR (por sus siglas en inglés: **steroidogenic acute regulatory protein**), cuya expresión está regulada por el cAMP (por sus siglas en inglés: **cyclic adenosine monophosphate**) y el estímulo de las hormonas FSH y LH (Kraemer y cols., 2013). Después, el colesterol es convertido a pregnenolona por el Cyp11a1 dentro de la mitocondria (Andersen y Ezcurra, 2014; Payne y Hales, 2004). La pregnenolona es hidroxilada, generando la 17 α -hidroxipregnenolona y posterior remoción del grupo acetilo para formar la dehidroepiandrosterona por la acción del Cyp17a1. Después, por acción de la Hsd3b1 se genera la androstenediona y posteriormente se forma la testosterona gracias a la acción de la enzima Hsd17b1. Una vez en las células de la granulosa, la testosterona, y en menor medida la androstenediona, es convertida a E₂ o estrona, respectivamente (Andersen y Ezcurra, 2014; Payne y Hales, 2004) (Figura 4).

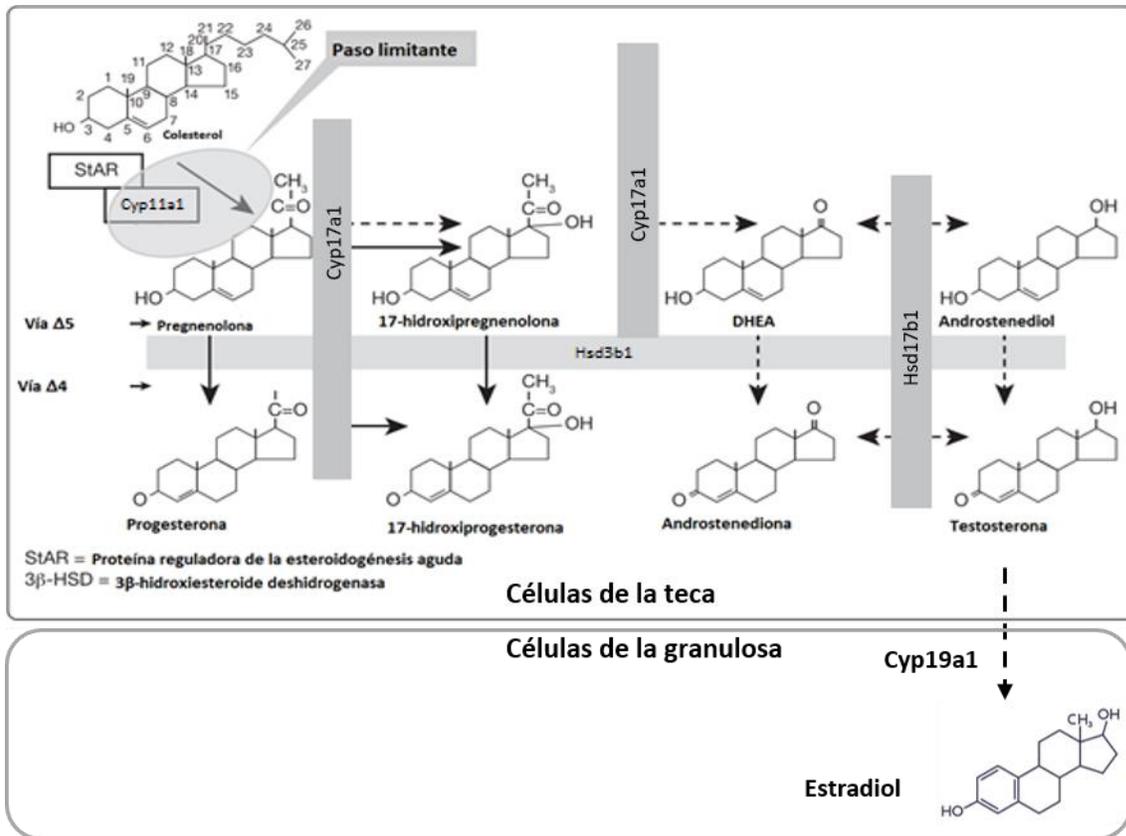


Figura 4. Esteroidogénesis humana ovárica. Las líneas punteadas muestran la vía Δ^5 del metabolismo de la pregnenolona. Las líneas continuas muestran la ruta alternativa del metabolismo de la pregnenolona. Tomada y traducida de Andersen y Ezcurra (2014).

1.4 Efectos de las NP en el aparato reproductor

Los órganos reproductivos, así como el sistema endocrino son muy sensibles a la toxicidad de muchos xenobióticos, al estrés, a los metales pesados, microondas y NP (Hong y cols., 2016). Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito alteraciones en los aparatos reproductores masculino y femenino después de la exposición a distintos tipos de NP, evidenciando que éstas pueden alcanzar los órganos reproductores y alterar las funciones normales (Hong y cols., 2016; Stelzer y Hutz, 2009; Tiedemann y cols., 2014; Xu y cols., 2012; Zhao y cols., 2013).

1.4.1 Reprotoxicidad de las NP de dióxido de titanio

Algunos estudios han evaluado el efecto de las NP de TiO₂ sobre el aparato reproductor masculino y han encontrado acumulación de titanio en los testículos, alteración en la actividad de proteínas antioxidantes e incremento en los niveles de apoptosis, entre otros. Hong y cols. (2016) encontraron que la exposición por 8 meses a NP de TiO₂ anatasa (5 mg/kg de peso) en ratones macho disminuye la tasa de apareamiento y embarazo, así como el número de fetos vivos al nacer. Esta exposición también incrementó el número de células inflamatorias en los testículos, así como alteraciones histopatológicas.

En otro estudio se observó un incremento en los niveles de titanio de manera dependiente de la dosis en los testículos de rata que fueron inyectadas *i.v.* con NP de TiO₂ (10-20 nm) en su forma alotrópica anatasa por 30 días en intervalos semanales, sugiriendo que estas NP pueden atravesar la barrera hematotesticular y acumularse en la gónada. En ese estudio también encontraron una alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPX (25 y 50 mg/kg peso corporal), así como un incremento de la apoptosis espermática (25 y 50 mg/kg por día), por lo que los autores sugirieron que la exposición a NP de TiO₂ induce estrés oxidante, y que éste promueve el incremento en los niveles de apoptosis. Ese estudio también evaluó si las NP de TiO₂ afectaban los niveles de testosterona, hormona importante para el desarrollo normal del espermatozoide, y observaron una disminución en sus niveles en suero (25 y 50 mg/ kg por día) (Meena y cols., 2015).

Algunos estudios que han evaluado los efectos de las NP de TiO₂ sobre el sistema reproductivo femenino han evidenciado que el titanio llega a los ovarios y afecta su función. Zhao y cols. (2013) realizaron un estudio en ratones hembra expuestos vía *i.g.* por 90 días y encontraron acumulación de titanio en los ovarios, disminución en el peso corporal y en el

peso relativo del ovario, así como una disminución en la tasa de apareamiento, tasa de embarazo y en el número de recién nacidos, todo de manera dependiente de la dosis (desde 2.5 mg/kg hasta 10 mg/kg de peso corporal). Este mismo estudio también evaluó el efecto de las NP de TiO₂ sobre los niveles hormonales y se observó una disminución en los niveles de E₂, progesterona, LH, FSH y testosterona de manera dependiente de la dosis, así como un incremento en la expresión de distintas citosinas sugiriendo un incremento en la atresia en el ovario. Otro estudio que usó peces como modelo y una concentración de 100 µg/L de NP de TiO₂ anatasa también confirmó que las NP de TiO₂ pueden acumularse en el ovario y además, que el bisfenol-A es capaz de adsorberse a estas NP e incrementar su ingreso, conduciendo a una disminución en los niveles de hormonas esteroideas (E₂ y testosterona) y de FSH y LH circulantes (Fang y cols., 2016).

1.4.2 Reprotoxicidad de las NP de zinc

Aunque distintos estudios han evidenciado el potencial tóxico de las NP de ZnO en distintos modelos, existen pocos estudios que hayan reportado efectos sobre parámetros reproductivos. Han y cols. encontraron que las células de Leydig y Sertoli fueron capaces de internalizar a las NP de ZnO (70 nm) y que los niveles de apoptosis incrementan como consecuencia del daño al DNA debido al incremento en las ROS, después de una exposición *in vitro*. Mientras que *in vivo*, los autores encontraron que las NP de ZnO fueron capaces de generar alteraciones en el epitelio seminífero, así como anomalías espermáticas. Barkhordari y cols. (2013) encontraron que la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a NP de ZnO (10, 100, 500 y 1000 µg/mL por 45, 90 y 180 min) incrementa los niveles de células apoptóticas de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, no evaluaron otros parámetros de importancia. Otro estudio mostró una disminución en parámetros de calidad espermática

como motilidad, morfología, viabilidad y concentración después de una exposición *in vivo* por vía *i.p.* a partir de 100 mg/kg de peso corporal durante 10 días (50-200 mg/kg de peso corporal) así como un incremento en el estrés oxidante en suero (Abbasalipourkibir y cols., 2015).

Actualmente los estudios que evalúan la toxicidad de las NP de ZnO son pocos y se enfocan especialmente en los efectos sobre el aparato reproductor masculino. Hasta ahora, pocos estudios ofrecen información respecto a su reprotoxicidad femenina. Liu y cols. (2016) detectaron a estas NP en tejido ovárico de gallina y encontraron que la exposición *in vivo* reduce el índice de órganos ováricos. Además, esta exposición fue capaz de alterar la expresión y niveles proteicos de distintos factores neuronales, así como la población de células neuroendocrinas alterando los niveles de elementos esenciales en el ovario. Por lo anterior los autores sugieren que estos materiales pueden afectar negativamente el desarrollo ovárico en la pubertad. Otro estudio, empleando células de la granulosa de gallina mostró que las NP son capaces de regular la expresión específica de genes y proteínas que participan en el desarrollo y reproducción (Zhao y cols., 2015). Finalmente, otro estudio realizado en ratas expuestas a NP de ZnO (500 mg/kg de peso corporal) vía oral mostró un incremento en el peso del útero, así como una disminución en el número de recién nacidos y de crías vivas y disminución en la ganancia de peso corporal después de 4 días (Jo y cols., 2013). Lo anterior sugiere que las NP de ZnO son capaces de llegar a las células ováricas y alterar su funcionalidad. Sin embargo, es necesario que se realicen estudios en otros modelos para que la información generada pueda ser empleada en la determinación del potencial reprotóxico de estas NP.

En resumen, aunque existen algunos estudios evaluando efectos a nivel reproductivo femenino por la exposición a NP de TiO₂ y ZnO, y que dicha toxicidad se ha atribuido de manera general a la capacidad de estas NP metálicas de generar ROS, son pocos los estudios que se enfoquen en dilucidar tanto la interacción de estas NP con las células del ovario, así como los efectos directos de dicha interacción. En este contexto, también es relevante evaluar si hay generación de ROS por una exposición directa de las células del ovario a las NP y si esto puede ser el mecanismo principal de toxicidad reproductiva.

1.5 Justificación

Las NP de TiO₂ y ZnO son ampliamente utilizadas en distintos productos de uso cotidiano incluyendo cosméticos, cremas, alimentos y agua de bebida, entre otros, por lo que pueden ingresar por más de una vía al organismo. Estudios previos describen alteraciones en los niveles hormonales, expresión de genes implicados en la foliculogénesis y esteroidogénesis, disminución en la fertilidad etc. así como la generación de ROS. Sin embargo, estos estudios no describen si los efectos observados se deben a un daño directo de estos materiales sobre las células del ovario. Las características fisicoquímicas y el recubrimiento, entre otros, pueden modificar la respuesta de los sistemas biológicos ante las NP o el efecto que pueden causar. Una de las principales vías mediante las cuales las NP son capaces de alterar la función celular es mediante la generación de ROS. Hasta ahora, son pocos los estudios realizados a nivel reproductivo, y en particular en el ovario, que hayan determinado los efectos tóxicos por la exposición a nanomateriales. Tampoco se ha determinado si estos efectos están relacionados con la inducción de estrés oxidante. Por lo anterior, es de suma importancia que se evalúen los efectos de los nanomateriales, en particular las NP de TiO₂ y ZnO, sobre distintos parámetros funcionales del folículo (unidad funcional del ovario), para

facilitar la comprensión del potencial repro-tóxico de los mismos, así como sus mecanismos de toxicidad.

1.6 Hipótesis

La exposición a las NP de TiO₂ y de ZnO afectará la función del folículo antral de manera diferencial dependiendo de las características fisicoquímicas de las NP y estos efectos se relacionarán con la generación de ROS.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a las NP de TiO₂ y de ZnO sobre parámetros morfológicos y funcionales del folículo antral, y su relación con las características fisicoquímicas y con la generación de ROS.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las NP por medio del tamaño primario, diámetro hidrodinámico, índice de polidispersión y carga de superficie, entre otras.
2. Evaluar el efecto de las NP sobre la actividad metabólica de los folículos antrales *in vitro*.
3. Evaluar la internalización de las NP, así como su localización en el folículo antral.
4. Evaluar el efecto de la exposición a las NP sobre la ultraestructura del folículo antral.
5. Evaluar el efecto de las NP sobre el crecimiento y morfología del folículo antral.
6. Determinar el efecto de las NP sobre la capacidad esteroidogénica del folículo antral cuantificando los niveles de hormonas.
7. Evaluar si la exposición a las NP afecta la vía esteroidogénica del folículo.

8.- Determinar el efecto de las NP sobre la inducción de atresia y ciclo celular en el folículo antral.

9.- Evaluar la inducción de estrés oxidante en el folículo antral.

2 Métodos

2.1 Diseño experimental

El diseño experimental consta de varias etapas que corresponden a la caracterización fisicoquímica de las NP, la evaluación de la interacción de las NP con el folículo antral, la evaluación de los efectos de las NP sobre reguladores de la apoptosis y del ciclo celular, la evaluación de la inducción del estrés oxidante, así como la determinación de los efectos de estos materiales sobre la esteroidogénesis. Para ello se emplearon folículos antrales de ratones hembra de las cepas C57BL6/J y CD1, Las figuras 5 y 6 resumen el diseño experimental.

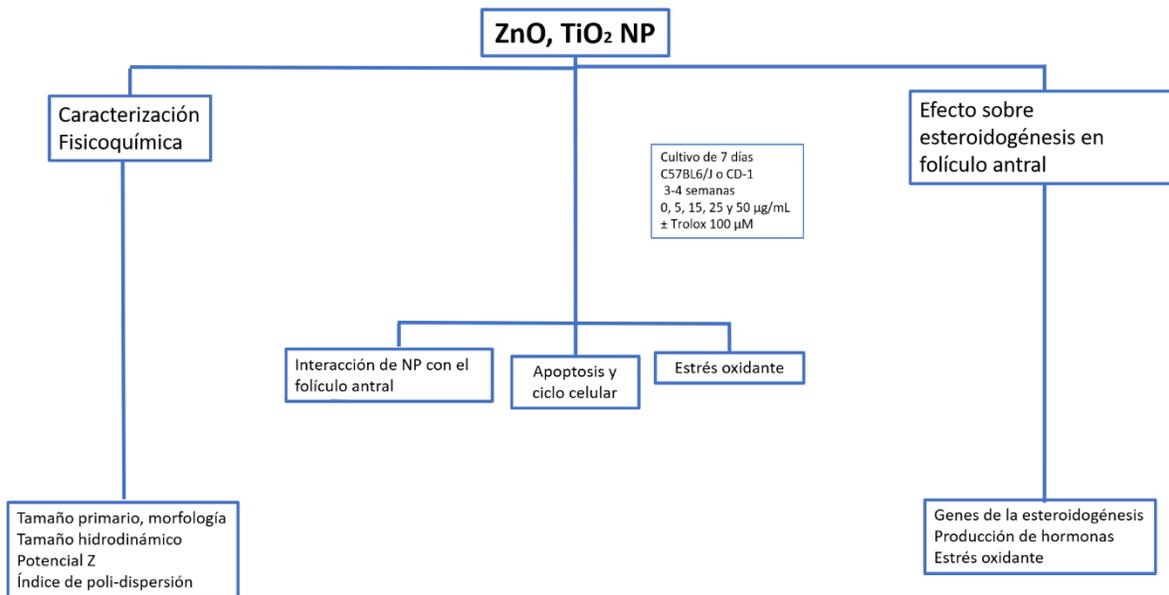


Figura 5. Diseño experimental del estudio. El diseño experimental se dividió en varias etapas. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada evaluación *in vitro*.

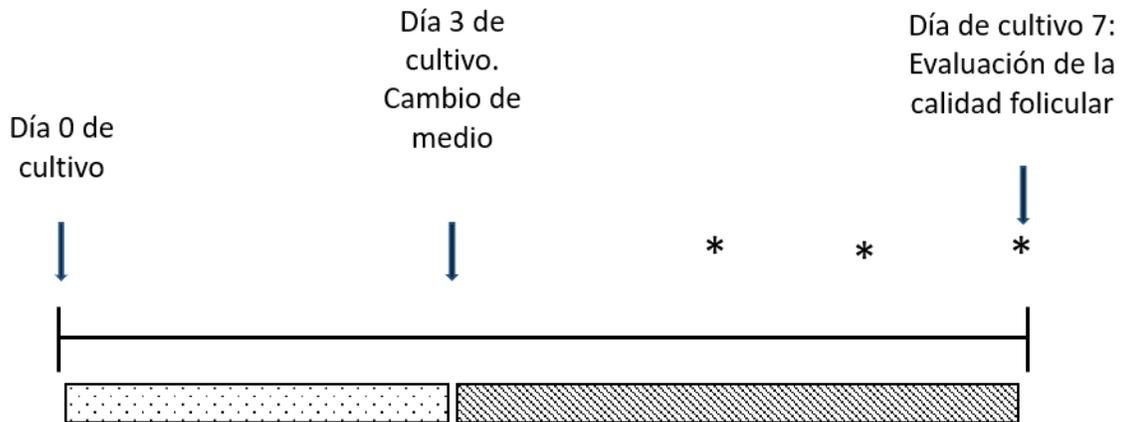


Figura 6. Diseño experimental del cultivo *in vitro* del folículo antral. Folículos antrales se cultivaron en medio suplementado. En el día 3 de cultivo se realizó un cambio de medio que incluía las nanopartículas (NP) de TiO₂ o ZnO a diferentes concentraciones. La exposición a las NP se mantuvo del día 3 al 7, lo que corresponde a 96 h. La caja punteada indica el cultivo del día 0 al 3 usando solo medio suplementado. La caja rayada indica el cultivo del día 3 al 7 usando medio suplementado más NP de TiO₂ o de ZnO, lo que corresponde a un periodo de exposición a NP de 0 a 96 h. * Indica ensayos de MTT (5, 25 y 50 µg/mL) a las 48, 72 y 96 h de exposición a las NP, así como la cuantificación de ROS en folículos expuestos a NP de TiO₂ (25 µg/mL) y NP de ZnO (15 µg/mL). Los parámetros de exploración y de función folicular (expresión de genes, cuantificación de hormonas, etc.) se evaluaron a las 96 h.

2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

2.2.1 Principio

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés: **t**ransmission **e**lectron **m**icroscopy) permite observar estructuras que tienen longitudes por debajo de los 100 nm. Un haz de electrones, generado por una fuente de tungsteno o lantano, gracias a su carácter ondulatorio, es enfocado por aperturas metálicas y lentes electromagnéticas en la columna del microscopio. Este haz de electrones es aplicado al espécimen, los electrones transmitidos son enfocados y magnificados por un sistema de lentes que consta de dos lentes después del espécimen, que finalmente es proyectado en una pantalla de fósforo para convertir la imagen de electrones en una forma visible (Tang y Yang, 2017).

2.2.2 Procedimiento

Para determinar el tamaño primario de las dos NP, se prepararon suspensiones de 100 $\mu\text{g/mL}$ en isopropanol que después fueron sometidas a sonicación por 1 min. Una gota de las suspensiones se colocó en rejillas de cobre Lacey Formvar/carbon de 300 hoyos (01883-F) y se observó en un microscopio electrónico (JEM 2010, Jeol Ltd.). Se tomaron micrografías de distintas zonas de la rejilla al azar, y se midieron al menos 400 NP usando el programa Gatan Digital Micrograph (versión 3.32.2403.0) para determinar la distribución de tamaño de ambas NP.

2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

2.3.1 Principio

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés: scanning electron microscopy) es ampliamente utilizada para determinar la superficie de materiales. Similar a la TEM, se genera un haz de electrones que es enfocado y dirigido a la muestra de interés al vacío. Sin embargo, a diferencia del TEM, donde se analizan los electrones transmitidos, en el SEM se analizan los electrones que son dispersados por la muestra y después procesados para formar una imagen. Esta técnica provee información sobre la topografía, morfología, incluso el tamaño y forma de la muestra (Akhtar y cols., 2018).

2.3.2 Procedimiento

Para conocer la superficie de las NP mediante SEM, se prepararon suspensiones de 100 $\mu\text{g/mL}$ en isopropanol que después fueron sometidas a sonicación por 1 min. Una gota de las suspensiones se colocó en una cinta de carbón y la muestra se dejó secar toda la noche. Al

día siguiente, las rejillas se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (AURIGA 3916-FESEM, Oberkochen, Alemania). Se tomaron micrografías representativas de las muestras para su análisis.

2.4 Espectroscopía de rayos X

2.4.1 Principio

La espectroscopía de rayos X (EDS, por sus siglas en inglés: **energy-dispersive X-ray spectroscopy**) es un método para detectar y cuantificar la composición elemental en una muestra muy pequeña de material. En un microscopio electrónico de transmisión equipado, al ser excitados por el haz de electrones, los átomos en la superficie de una muestra emiten rayos X de determinadas longitudes, que son característicos de la estructura atómica de cada elemento que conforma el material. Un detector se emplea para analizar estas emisiones de rayos X, las cuales son asignadas a su elemento correspondiente (Ebnesajjad, 2014).

2.4.2 Procedimiento

Para determinar la composición elemental de las dos NP, se prepararon suspensiones de 100 µg/mL en isopropanol que después fueron llevadas a sonicación por 1 min. Una gota de las suspensiones se colocó en rejillas de cobre Lacey/Formvar/carbon de 300 hoyos (01883-F). Después, las rejillas con las NP se analizaron en un microscopio electrónico (JEM 2010, Jeol Ltd. Tokio, Japon) para obtener los espectros de EDS, así como la cuantificación elemental. Esta técnica permite corroborar la ausencia de impurezas en la muestra.

2.5 Difracción de rayos X

2.5.1 Principio

La difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés: **X-ray diffraction**) mide la distancia entre planos atómicos sucesivos, así como la posición de los átomos o iones dentro de un cristal, permitiendo la determinación de la estructura cristalina (Nguyen y Harbison, 2017). La información generada se emplea para detectar minerales al tiempo que se evalúa la estructura y simetría de estos, y permite conocer la proporción relativa de mezclas de minerales.

2.5.2 Procedimiento

Las NP fueron analizadas en un difractómetro de rayos X (Siemens D-5000, Munich, Alemania). Las condiciones de trabajo del generador de rayos X fueron: un voltaje de 35 mV y una corriente de 25 mA. Se empleó un filamento de cobre como fuente de radiación ($Cu K_{\alpha 1} = 1.5418 \text{ \AA}$) y un intervalo de barrido de 20° a 100° para las mediciones.

2.6 Dispersión de las NP

2.6.1 Principio

Cuando las NP se suspenden en un medio, diferentes fuerzas influyen sobre ellas. Por un lado, la fuerza gravitacional induce la sedimentación de los materiales, por otro lado, estas partículas tienen un movimiento browniano (movimiento al azar de las partículas en un fluido) (Bruinink y cols., 2015), que contribuye a su difusión en el medio y a la interacción NP-NP, promoviendo la formación de agregados/aglomerados de tamaño variable. Dado que

el estado de dispersión de las NP afecta su bio-reactividad, se estableció un protocolo de dispersión. La dispersión de las NP se llevó a cabo mediante una sonicación con punta (Ultrasonic processor, GEX130PB). Se preparó un stock de NP (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en agua doble desionizada estéril (dd- H_2O), que se sometió a sonicación durante diferentes tiempos. En cada tiempo de sonicación se determinó el diámetro hidrodinámico (DH) y el índice de polidispersión (PDI, por sus siglas en inglés: **polydispersion index**). Finalmente, después de analizar los datos, se eligió el tiempo de sonicación que generó un DH y PDI más bajo. Este protocolo se realizó siempre antes de llevar los volúmenes del stock al medio de cultivo para obtener las concentraciones de exposición.

2.7 Dispersión dinámica de la luz

2.7.1 Principio

El tamaño hidrodinámico de las partículas en suspensión se evaluó mediante dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés: **dynamic light scattering**). Como se mencionó anteriormente, en suspensión, las partículas tienen un movimiento browniano, por lo que la dispersión de la luz presenta variaciones en el tiempo. Con el empleo de esta técnica se puede realizar una autocorrelación de las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada para determinar el coeficiente de difusión de las partículas. Posteriormente, el promedio del tamaño hidrodinámico puede ser estimado a partir de este coeficiente con el empleo de la ecuación de Stokes-Einstein (Jiang y *cols.*, 2009).

2.7.2 Procedimiento

Se realizó el protocolo de dispersión de NP de acuerdo con lo antes descrito. Después, se suplementó el medio de cultivo y se agregaron los volúmenes correspondientes de stock de NP para obtener las concentraciones que se usaron en el estudio. Se prepararon suspensiones de NP de TiO₂ (5, 25 y 50 µg/mL) y ZnO (5, 10, 15 y 25 µg/mL) y se colocó 1 mL en una celda de poliestireno de 1 x 1 x 5 cm. El tamaño hidrodinámico se determinó en el equipo Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments Ltd, UK).

2.8 Electroforesis de Laser tipo Doppler (LDE)

2.8.1 Principio

El potencial zeta (ζ) es un potencial eléctrico creado entre los grupos asociados a la superficie de las NP y el medio de suspensión, que puede ser empleado para obtener información acerca de la carga de superficie de la partícula (Cho y cols., 2012). Cuando un campo eléctrico es aplicado a una dispersión, las partículas cargadas se moverán hacia el electrodo de carga opuesta, lo que se denomina electroforesis. Si un rayo láser pasa a través de una dispersión que está en electroforesis, la luz dispersada por las partículas en movimiento (Browniano) será desplazada. Midiendo el desplazamiento de la frecuencia se puede determinar la movilidad electroforética, considerando la longitud de onda y el ángulo de dispersión. Finalmente, con la ecuación de Smoluchowski se puede determinar el ζ a partir de la movilidad electroforética (Jiang y cols., 2009).

2.8.2 Procedimiento

Se realizó el protocolo de sonicación y después se prepararon las suspensiones en el medio de cultivo como en el punto anterior. Se colocó 1 mL de las suspensiones en celdas de poliestireno y se determinó el ζ en el equipo Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK).

2.9 Modelo animal

Se utilizaron ratones hembra de las cepas C57BL/6J y CD1 de 28-32 días de edad. Los ratones C57BL/6J fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN, mientras que los ratones CD1 se obtuvieron de laboratorios Charles River (Charles River, CA). Los ratones fueron tratados y manejados de acuerdo con los lineamientos internacionales para el uso y cuidado de animales de laboratorio, y al protocolo 0147-15, aprobado por el Comité de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav-IPN (CICUAL), así como por el comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. Las hembras se mantuvieron en cajas de polisulfonato con ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h y se alimentaron con comida estándar y agua *ad libitum*.

2.10 Cultivo primario de folículos antrales y exposición a NP

El cultivo de folículos se realizó de acuerdo con lo descrito por Hernández-Ochoa y *cols.* (2013), con modificaciones menores. Brevemente, los ratones hembra fueron sacrificados para la disección de los ovarios, los cuales se usaron para el aislamiento de folículos antrales. El aislamiento se llevó a cabo en medio α -mínimo esencial (α -MEM) bajo un microscopio

estereoscópico por remoción mecánica con pinzas de punta fina Dumont no. 5. (Wood Dale, IL, EE.UU). La selección de los folículos antrales se realizó con base en su apariencia y tamaño relativo (250-400 micras). Posteriormente, los folículos se sembraron individualmente en una placa de cultivo de 96 pozos con 150 μ L de medio α -MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), ITS (10 ng/mL insulina, 10 ng/mL de transferrina y 0.01 ng/mL de selenio), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina y 5 UI/mL de FSH recombinante, y fueron divididos en los siguientes grupos de tratamiento: 0, 5, 25 y 50 μ g/mL de NP de TiO₂, y 0, 5, 10, 15 y 25 μ g/mL de NP de ZnO (se incluyeron y se eliminaron nuevas concentraciones basados en los resultados de actividad metabólica). Los folículos se incubaron durante 7 días a 37 °C, 5% de CO₂ y humedad saturada, con un cambio de medio de cultivo en el día 3. Los primeros 3 días del cultivo, sólo se empleó medio suplementado y en el cambio de medio se inició la exposición a NP (correspondiente a 0 h de exposición). Durante el tiempo de cultivo de los folículos se evaluó el crecimiento y morfología de los mismos. En el día 7 de cultivo (correspondiente a 96 h de exposición a las NP), los folículos se colectaron y se congelaron para la posterior extracción del ácido ribonucleico mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés: messenger ribonucleic acid) o para la determinación del ingreso de las NP mediante TEM. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes con 12-15 folículos por tratamiento en cada evaluación.

2.11 Ensayo de metabolismo celular mediante reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

2.11.1 Principio

Este ensayo involucra la oxidación del colorante amarillo y soluble en agua bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a una sal insoluble de formazán por acción de las enzimas reductasas localizadas en las mitocondrias. Después de su formación, el formazán puede ser solubilizado y la concentración se determina por densidad óptica a 570 nm (Kumar y cols., 2015). La capacidad de las células para metabolizar este compuesto es un indicador de la actividad metabólica de las mismas.

2.11.2 Procedimiento

Para determinar las concentraciones no citotóxicas, se determinó la actividad metabólica a distintas concentraciones de NP de TiO₂ (5, 25 y 50 µg/mL) y de ZnO (5, 15 y 25 µg/mL) y tiempos (48, 72 y 96 horas) de exposición. Los folículos antrales se cultivaron de acuerdo con lo antes descrito y a la figura 6. Después de 45, 69 y 93 horas de exposición, se agregaron 10 µg de un stock de MTT (5 mg/mL, filtrado) a 90 µL de medio por pozo y se incubó por 3.5 horas. Al término de la incubación, los pozos fueron lavados 3 veces con PBS, y después se agregaron 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán. Este volumen se tomó y se colocó en otra placa, la cual se leyó en un espectrofotómetro para microplacas (Infinite 200 Pro de TECAN, CA, EE. UU.) a 570 nm. Los resultados se graficaron y presentaron como porcentaje de actividad metabólica respecto al control.

2.12 Microscopía electrónica de transmisión para análisis de internalización

2.12.1 Principio

En el microscopio electrónico de transmisión, los electrones penetran un espécimen delgado y después se crea la imagen con el uso de lentes apropiados, de manera análoga al microscopio óptico. Sin embargo, esta microscopía emplea electrones, que son emitidos desde un filamento en el vacío, y después acelerados para finalmente incidir en una muestra. Debido a la longitud de onda, comparable a las dimensiones atómicas (≈ 0.17 nm), se puede visualizar al espécimen con una resolución espacial mucho mayor que en el microscopio óptico (Tang y Yang, 2017).

2.12.2 Procedimiento

Esta técnica se empleó para evaluar el ingreso y localización de las NP, así como para realizar un análisis de la ultraestructura del folículo antral. Después de la exposición a NP de TiO₂ (50 μ g/mL) o NP de ZnO (15 μ g/mL), los folículos fueron lavados 3 veces en PBS y se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % a temperatura ambiente durante 1 h. Después de 3 lavados en PBS, se realizó una post-fijación en tetraóxido de osmio al 1 % durante una hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron 3 veces más con PBS y se procedió a la deshidratación etanólica de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 1. Procedimiento de deshidratación de las muestras. Las muestras fueron deshidratadas por medio de la incubación con distintas concentraciones de etanol, de acuerdo con los tiempos especificados.

Concentración de etanol	Tiempo de incubación (min)
50 %	10
60 %	10
70 %	10
80 %	10
90 %	10
100 %	15 por triplicado

Posteriormente, se realizó la infiltración y polimerización con resina Epon (Electronic Microscopy Sciences, PA, EE.UU.). Finalmente, los bloques fueron procesados para obtener pirámides y seccionar en un ultra-microtomo (Leica EM UC7, Wetzlar, Alemania) con cuchillas de vidrio. Se prepararon rejillas de cobre de un hoyo con polivinil forvar en cloroformo al 0.3 % y se guardaron hasta su uso. Posteriormente, secciones semi-finas se obtuvieron y aproximadamente cada 15, fueron teñidas con azul de metileno para observar en microscopio óptico con el objetivo de determinar la presencia del ovocito en los cortes. El proceso se repitió hasta que el ovocito fue observado en las secciones. Se cortaron secciones ultrafinas (70-80 nm) y se montaron en rejillas de un hoyo para posteriormente ser teñidas con uranilo (1 hora) y plomo de Reynolds (10 min). Las secciones se observaron en un microscopio electrónico JEM 1400 (JEOL Ltd) en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE-Cinvestav).

2.13 Inmunofluorescencia de las células del folículo

2.13.1 Principio

La inmunofluorescencia es una técnica inmunoquímica que permite la visualización de componentes (antígenos) en muchos tipos de tejidos o célula. Lo anterior gracias a la combinación de anticuerpos específicos acoplados a señales fluorescentes. En general, emplea pruebas fluorescentes conjugadas ya sea a un anticuerpo primario o a uno secundario, que están dirigidos a un blanco en específico. La señal generada puede ser observada en un microscopio de epifluorescencia convencional o en un microscopio confocal (Mori y Cardiff, 2016).

2.13.2 Procedimiento

Los folículos antrales se cultivaron sobre cubreobjetos en una caja Petri de 35 mm de acuerdo con el esquema de exposición mencionado (3 días sin NP y 96 horas expuestas a NP) y después fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 10 min, permeabilizados con Triton X-100 al 0.2 % y bloqueados con 0.5 % de suero fetal bovino y 3 % de albumina de suero bovino. Se realizaron lavados y se incubó el anticuerpo primario anti- α -tubulin-FITC (Sigma Aldrich) 1:500 con PBS. Después de lavar, los cubreobjetos se incubaron con Hoescht 33342 (5 μ g/mL) durante 10 min para teñir el núcleo. Finalmente, se incubaron durante 15 min en faloidina-rodamina (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.) 1:500. Después de lavar en PBS, los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos con Vectashield (Vectorlabs, CA, EE.UU.). Se obtuvieron imágenes de epifluorescencia en un microscopio Olympus BX61 (Olympus, Tokio, Japón) para el análisis del efecto de las NP sobre el arreglo del citoesqueleto.

2.14 Determinación de radicales libres totales

2.14.1 Principio

La determinación de la generación de ROS se realizó con el OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay kit (Cell Biolabs, Inc., Ca, EE. UU.). El ensayo emplea la prueba DiOxyQ diclorofluoresceína, que es específica para ROS/RNS. Esta molécula se mezcla con un agente que favorece la liberación de la forma altamente reactiva DCFH, que se oxida rápidamente a 2,7-diclorofluoresceína (DCF). La fluorescencia generada es proporcional a la presencia de ROS/RNS en la muestra.

2.14.2 Procedimiento

La determinación de radicales libres se realizó a las 48, 72 y 96 h de exposición. El tejido se homogenizó y un volumen se empleó para cuantificar proteína por el método de BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit. 23225), mientras que el resto se empleó para cuantificar ROS/RNS de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Brevemente, las muestras y los estándares de ROS/RNS fueron agregados a pozos junto con un catalizador por duplicado y se incubaron por 5 min. Después, se agregó el diacetato de dicloro difluoresceína (DCFH) que da lugar a la reacción de oxidación del compuesto para obtener la 2,7-diclorofluoresceína (DCF), capaz de florecer (498/522 nm). La intensidad de la fluorescencia es proporcional a los niveles de ROS/RNS en la muestra. Finalmente, se determinó la fluorescencia en un lector de placas (SpectraMax Gemini EM, California, EE. UU.) y los valores obtenidos se normalizaron de acuerdo a la concentración de proteína en las muestras. Los resultados se presentan como URF/ng/mL de muestra, al control se le asignó arbitrariamente el número uno.

2.15 Cuantificación de niveles hormonales en suero

2.15.1 Principio

El ensayo de ELISA en fase sólida se basa en el principio de unión competitiva. Los pozos están recubiertos con anticuerpos dirigidos a antígenos de las hormonas de interés. Las hormonas presentes en la muestra compiten contra hormonas acopladas a una molécula enzimática por la unión al anticuerpo. Después de un tiempo de incubación, el conjugado (hormona-enzima) no unido es retirado con lavados y se permite la reacción enzimática (agregando un sustrato) capaz de producir un compuesto colorido. La concentración de hormona en la muestra es inversamente proporcional a la intensidad del color.

2.15.2 Procedimiento

Las hormonas progesterona, androstenediona, testosterona y E₂ fueron cuantificadas en el medio de cultivo colectado el día 7, es decir, a las 96 h de exposición a NP, mediante el uso de kits comerciales de Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas específicos para cada hormona (ELISAS, DRG International Inc., Springfield, NJ, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Aunque los detalles varían de un kit a otro, en general, el procedimiento es el mismo. Brevemente, se colocó un volumen determinado de los estándares, controles y muestras por duplicado en una placa de 96 pozos y se agregó el conjugado enzimático a cada pozo, se mezcló y dejó en incubación por diferentes tiempos (dependiendo de la hormona que se evaluó). Posteriormente, se realizaron 3-4 lavados con solución de lavado y se agregó la solución sustrato a cada pozo, se incubó por 15-30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción enzimática fue detenida y se procedió a

determinar la absorbancia en cada pozo. La concentración de las hormonas se determinó por medio de curvas estándar creadas mediante una regresión logística de 4 parámetros.

2.16 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR)

2.16.1 Principio

El método PCR en Tiempo Real (q-PCR) se basa en la amplificación *in vitro* de un fragmento específico de DNA a partir de pequeñas cantidades de DNA molde, en donde el producto se detecta conforme la reacción progresa. Comprende varios ciclos divididos en tres etapas: desnaturalización, hibridación y replicación. En cada ciclo se obtiene un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica. Esto se logra mediante la amplificación enzimática de un fragmento de DNA complementario (cDNA), generado a partir del RNA de interés usando una transcripción reversa (por medio de una transcriptasa reversa), adicionando una mezcla que incluya una polimerasa termoestable (Taq polimerasa), *primers* específicos para el gen de interés, deoxinucleotidos y un buffer de reacción. Los productos pueden ser cuantificados en cada ciclo mediante el uso de una molécula fluorescente, capaz de unirse al DNA de doble cadena, el cual genera un incremento directamente proporcional al producto creado en cada ciclo de la PCR.

2.16.2 Procedimiento

Después del cultivo, los folículos fueron colectados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta la extracción del RNA. El RNA total se aisló de los folículos antrales con el kit Micro RNAesy (Qiagen, Inc., Valencia, California) siguiendo las indicaciones del productor. El RNA se eluyó con 14 µL de agua libre de rnasas y la

concentración se determinó en un NanoDrop ($\lambda = 260$ nm; ND 1000; Nanodrop Technologies Inc., Delaware, EE.UU.). El cDNA se formó a partir del RNA total (100 ng) usando el kit iScript RT (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, EE.UU.) de acuerdo a las indicaciones del productor. La qPCR se realizó usando el sistema de detección CFX96 RealTime PCR (Bio-Rad Laboratories) así como el software CFX Manager de acuerdo con las indicaciones del proveedor. El equipo determina el producto de PCR generado cuantificando el colorante SsoFastEvaGreen (Bio-Rad Laboratories) que flúorese cuando se une al DNA de doble cadena. Oligos específicos para qPCR (Integrated DNA Technologies, Iowa, EE.UU.) de cada gen de interés se presentan en la tabla 2. Todas las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado usando 2 μ L de cDNA obtenido a partir de 1.67 ng de RNA total, oligos sentido y anti-sentido (7.5 pmol de cada uno) y el SsoFastEvaGreen Supermix en un volumen total de 10 μ L. EL programa de qPCR consistió en la activación enzimática (95 °C por 5 min), el programa de amplificación y cuantificación (36 ciclos de 94 °C por 10 s, 60 °C por 10 s, 72 °C por 10 s) una melt curve (65 °C-95 °C, 0.4 °C/s con lectura de fluorescencia continua) y un paso final a 72 °C por 2 min. Los datos de expresión se normalizaron a un gen de referencia (*Actb*) y los cambios relativos en la expresión de los genes de interés fueron calculados como el radio respecto al grupo control y analizados de acuerdo al método propuesto por Pfaffl (2001).

Tabla 2. Secuencias de los oligos para las reacciones de qPCR.

Gene name	Symbol	Forward primer	Reverse primer
Actine, beta	<i>B-act</i>	5'-GGGCACAGTGTGGGTGAC-3'	5'-CTGGCACCACACCTTCTAC-3'
Steroidogenic acute regulatory protein	<i>Star</i>	5'-CAGGGAGAGGTGGCTATGCA-3'	5'-CCGTGTCTTTTCCAATCCTCTG-3'
Cytochrome-P450 cholesterol side-chain cleavage	<i>Cyp11a1</i>	5'-AGATCCCTTCCCCTGGTGACAATG-3'	5'-CGCATGAGAAGAGTATCGACGCATC-3'
Cytochrome P450 steroid 17- α -hydroxylase 1	<i>Cyp17a1</i>	5'-CCAGGACCCAAGTGTGTTCT-3'	5'-CCTGATACGAAGCACTTCTCG-3'
3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1	<i>Hsd3b1</i>	5'-CAGGAGAAAGAACTGCAGGAGGTC-3'	5'-GCACACTTGCTTGAACACAGGC-3'
17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1	<i>Hsd17b1</i>	5'-AAGCGGTTCTGTGAGAAGTAG-3'	5'-ACTGTGCCAGCAAGTTTGCG-3'
Cytochrome P450 aromatase	<i>Cyp19a1</i>	5'-CATGGTCCCGGAACTGTGA-3'	5'-GTAGTAGTTGCAGGCACTTC-3'
Cyp P450 family 1 subfamily B member 1	<i>Cyp1b1</i>	5'-GCGACGATTCCTCCGGGCTG-3'	5'-TGCACGCGGGCCTGAACATC-3'
Nuclear respiratory factor 1	<i>Nrf2</i>	5'-TGAAGCTCAGCTCGCATTGA-3'	5'-TGCTCCAGCTCGACAATGTT-3'
Catalase	<i>Cat</i>	5'-GCAGATACCTGTGAACTGTC-3'	5'-GTAGAATGTCCGCACCTGAG-3'
Glutathione reductase	<i>Gsr</i>	5'-CAGTTGGCATGTCAAGCA-3'	5'-CGAATGTTGCATAGCCGTGG-3'
Superoxide dismutase 1	<i>Sod1</i>	5'-TTCCGTCCGTCGGCTTCTCGT-3'	5'-CGCACACCGCTTTCATCGCC-3'
Glutathione peroxidase	<i>Gpx</i>	5'-CCTCAAGTACGTCCGACCTG	5'-CAATGTCGTTGCGGCACACC-3'
Bcl2-associated X protein	<i>Bax</i>	5'-TGAAGACAGGGCCTTTTGTG	5'-AATTCGCCGGAGACTCG-3'
B cell leukemia/lymphoma 2	<i>Bcl2</i>	5'-ATGCCTTTGTGGAATATATGGC	5'-GGTATGCACCCAGAGTGATGC-3'
Caspase 3	<i>Cas3</i>	5'-TGGTGATGAAGGGTCATTTATG	5'-TTCGGCTTCCAGTCAGACTC-3'
Marker of proliferation Ki-67	<i>Ki67</i>	5'-GCTCACCTGGTCACCATCAA	5'-ACTACAGGAGCTGGATACG-3'
Cyclin-dependent kinase 4	<i>Cdk4</i>	5'-AGAAACCCTCGCTGAAGCGGCA	5'-TGGGGGTGAACCTCGTAAGGAGA-3'
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1a	<i>Cdkn1a</i>	5'-TTAGGCAGCTCCAGTGGCAACC	5'-ACCCCCACCACCACACACCATA-3'
FSH receptor	<i>Fshr</i>	5'-AGCAAGTTTGGCTGTTATGAGG	5'-GTTCTGGACTGAATGATTTAGAGG-3'
LH receptor	<i>Lhcgr</i>	5'-AACCCGGTGCTTTTTACAAACC	5'-TCCCATTGAATGCATGGCTT-3'
Androgen receptor	<i>Ar</i>	5'-GGCGGTCCTTCACTAATGTCAACT	5'-GAGACTTGTGCATGCGGTACTION-3'
Estrogen receptor α	<i>Esr1</i>	5'-AATTCTGACAATCGACGCCAG	5'-GTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC-3'

2.17 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm DE. La normalidad de los datos se corroboró mediante la aplicación de la prueba estadística de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov (si $p > 0.05$ la distribución de los datos se considera normal). Para la comparación de los distintos parámetros entre los grupos, se realizó una prueba ANOVA cuando los datos presentaron una distribución normal y una prueba de Kruskal Wallis cuando los datos no presentaron una distribución normal. Para comparaciones de más de dos grupos se empleó la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba poshoc Dunnet. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ para todos los casos. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism Version 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego CA, EU) y SPSS (SPSS Inc., Chicago IL, EE. UU.).

3 Resultados

Como se comentó previamente, este proyecto se dividió en varias etapas, los resultados se presentan conforme a las mismas.

3.1 Caracterización fisicoquímica de las NP

3.1.1 Composición elemental de las NP

Para comprobar la composición elemental de las NP empleadas en este trabajo, éstas fueron analizadas mediante EDS en un microscopio electrónico de transmisión. La figura 7 muestra la EDS por energía dispersiva para las NP de TiO_2 y las de ZnO donde se observa el patrón característico de cada NP, confirmando su composición elemental. La tabla 3 muestra las concentraciones de los elementos de ambas NP; las NP de TiO_2 tenían una composición de 84% de oxígeno y 16% de titanio, mientras que las NP de ZnO tenían una composición de 84% de oxígeno y 16% de zinc. Estos resultados confirmaron la identidad de las NP y que no existía contaminación o impurezas en ninguna de las NP empleadas.

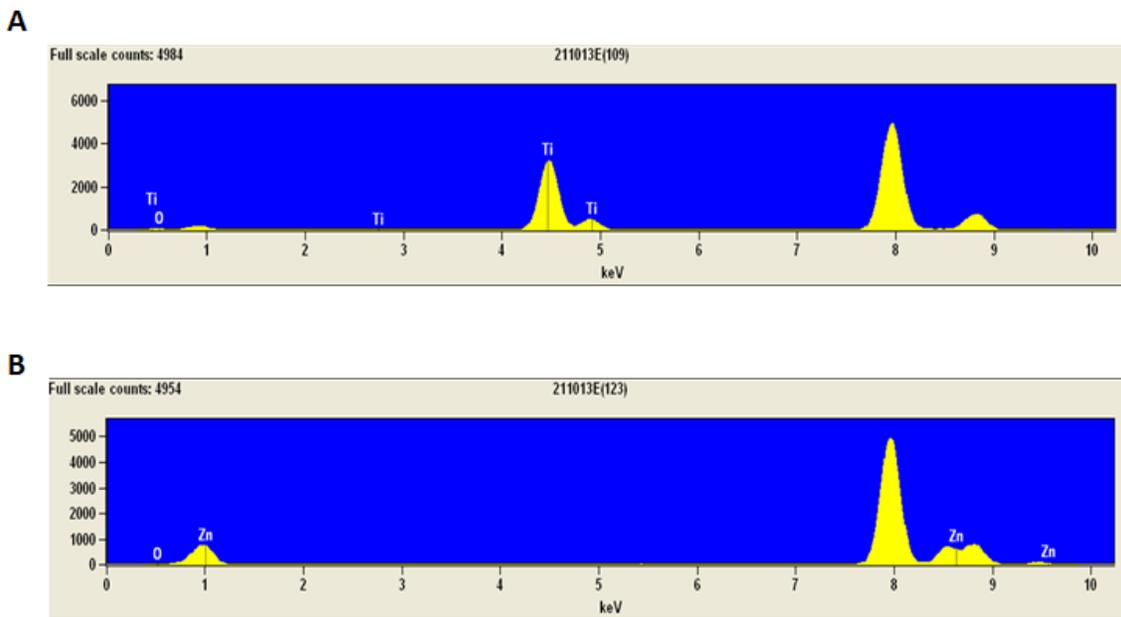


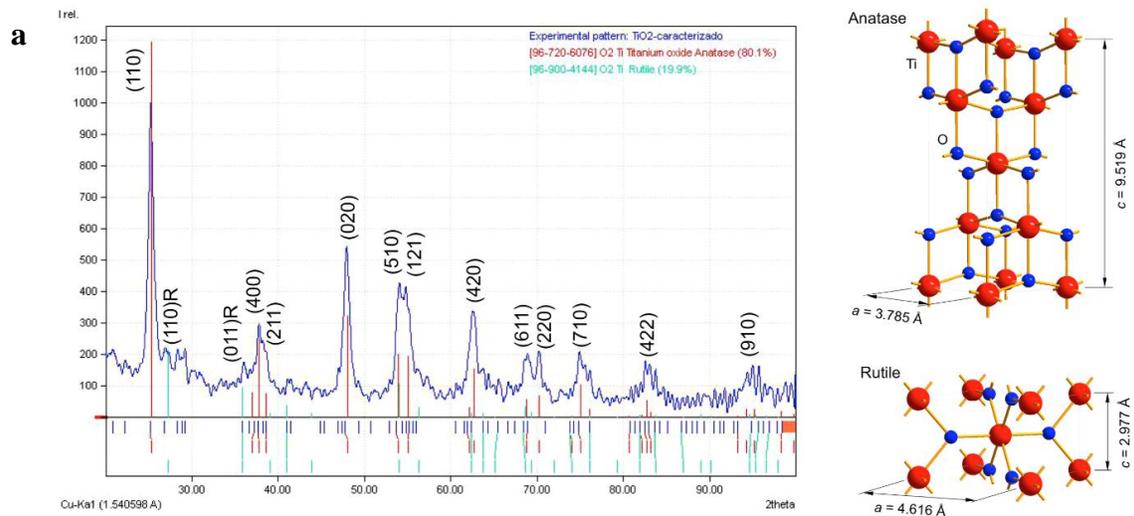
Figura 7. Espectro de espectroscopía de rayos X (EDS) por energía dispersiva. Las NP de TiO₂ y de ZnO se suspendieron y dispersaron en rejillas de cobre y fueron analizadas por EDS. Se muestra el espectro de EDS para TiO₂ (**A**) y para ZnO (**B**). El pico que se observa en 8 keV y cerca de 9 keV corresponde al cobre de las rejillas que se emplearon. keV, kilo electronvoltios.

Tabla 3. Composición elemental de las NP de TiO₂ y ZnO.

Elemento	Peso del elemento (%)	Átomo (%)
O	63.9 ± 10.5	83.90 ± 14.06
Ti	36.1 ± 0.3	16.10 ± 0.16
O	58.5 ± 20.0	84.45 ± 32.08
Zn	41.5 ± 1.4	15.55 ± 0.54

O, oxígeno; Ti, titanio; Zn, zinc.

La estructura cristalina de ambas NP se analizó mediante XRD. Los patrones de difracción de rayos X generados experimentalmente fueron comparados con patrones de referencia de una base de datos, para así identificar la estructura cristalina del compuesto en la muestra. Los programas MATCH! (3.7.1) y Diamond (3.0) se emplearon para el análisis del patrón de XRD y de la estructura cristalina, respectivamente. En la figura 8 se muestran los patrones de difracción de rayos X que indican que las NP de TiO_2 se encuentran como anatasa (80%) y rutilo (20%) (figura 8a), mientras que las NP de ZnO están conformadas de la estructura cristalina zincita (figura 8b). Además, se realizó una simulación de la estructura cristalina con el uso del programa Diamond (Crystal Impact, Bonn, Alemania). La figura 8, panel superior derecho muestra la estructura cristalina de las NP de TiO_2 y la figura 8, panel inferior derecho muestra la de las NP de ZnO .



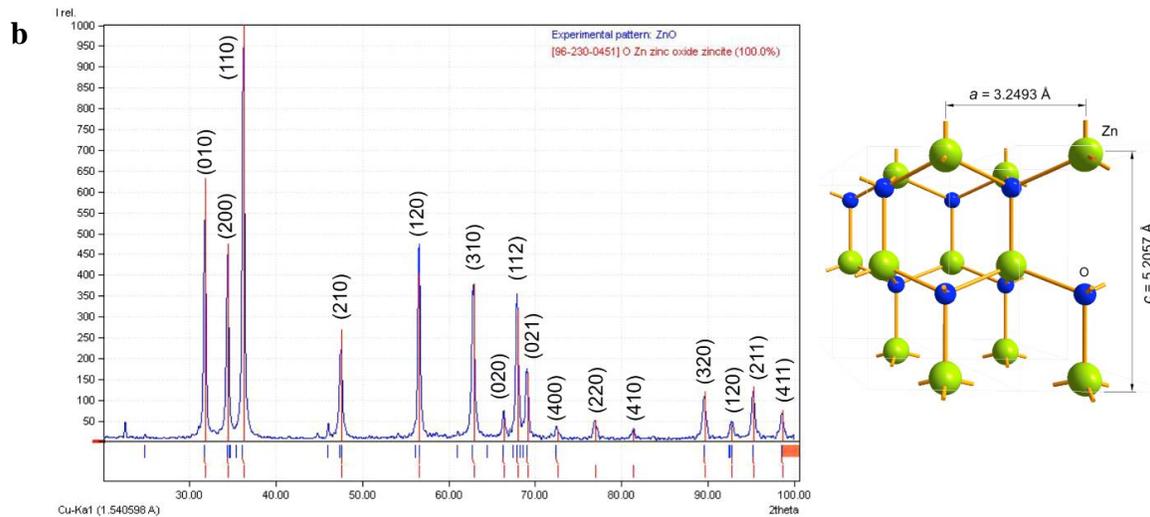


Figura 8. Patrón de difracción de rayos X de las NP de TiO₂ y de ZnO. Las NP fueron analizadas mediante difracción de rayos x (XRD). En **a** se muestra el patrón de XRD y la contribución de la fase tetragonal de anatasa (80.1%) y rutilo (19.9%) para TiO₂. En **b** se presenta el patrón de XRD y la fase hexagonal de zincita. Å, angstrom.

Adicionalmente, se tomaron imágenes de microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés: **high-resolution transmission electron microscopy**) que confirman la estructura cristalina. En la figura 9 se muestran imágenes de alta resolución de microscopía electrónica de transmisión de las NP de TiO₂, mientras que en la figura 10 se muestran imágenes de HRTEM para las NP de ZnO. Además, se muestra la vista y orientación estructural de los átomos que conforman las NP de TiO₂ (figura 9c y 9e) y las de ZnO (figura 10c) correspondientes a las imágenes analizadas mediante HRTEM.

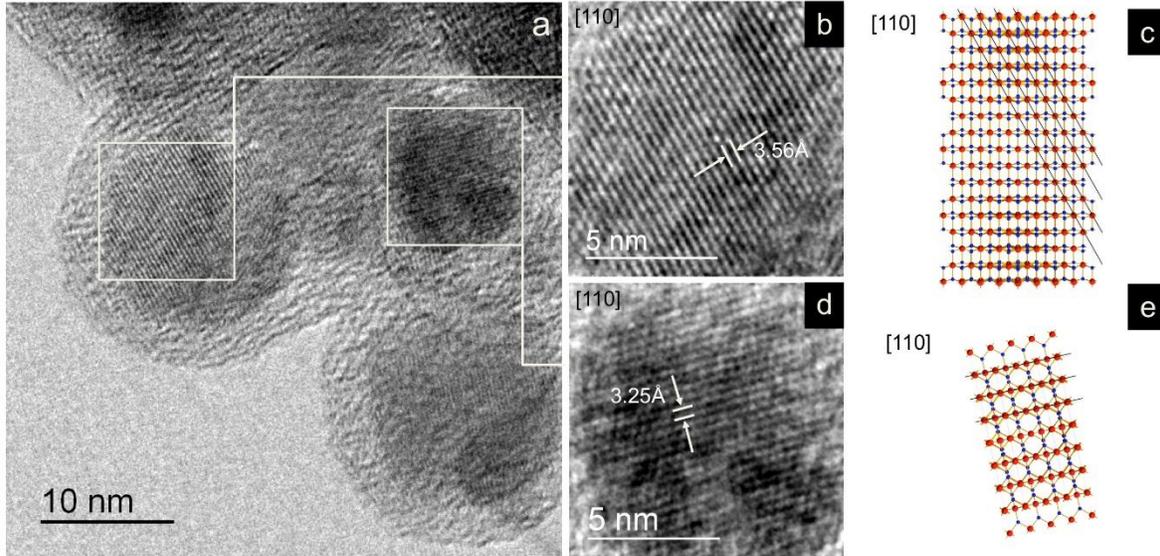


Figura 9. Microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) de las NP de TiO₂. (a) imagen de HRTEM global y estructura cristalina, (b) orientación estructural de anatasa a [110], (c) vista estructural, (d) estructura de rutilo a [110] y (e) orientación estructural. Å, angstrom.

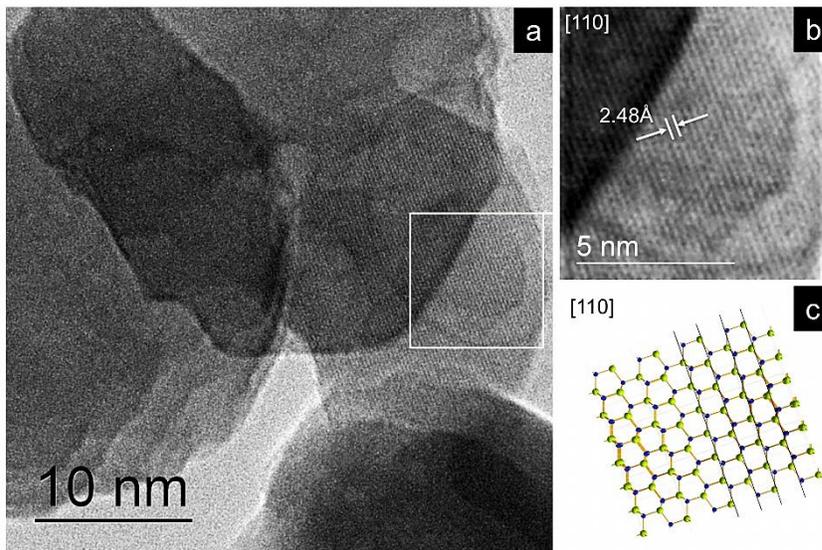


Figura 10. Microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) de las NP de ZnO. (a) HRTEM global y estructura cristalina, (b) aumento del área seleccionada de la imagen global de la estructura cristalina zincita a [110], (c) vista estructural. Å, angstrom.

3.1.2 Tamaño primario y morfología de las NP

Ambas NP fueron analizadas mediante TEM y SEM para determinar el tamaño primario y la morfología. Las NP de TiO_2 tenían un tamaño primario promedio de 17 nm, una distribución de tamaño de 7 a 39 nm (figura 12a) y una morfología esférica (figuras 11a y 11c). Las NP de ZnO , por otro lado, tenían un tamaño de 37 nm, una distribución de tamaño entre 13 y 89 nm (figura 12b), y en general presentaron una morfología irregular o de esferoides (figuras 11b y 11d).

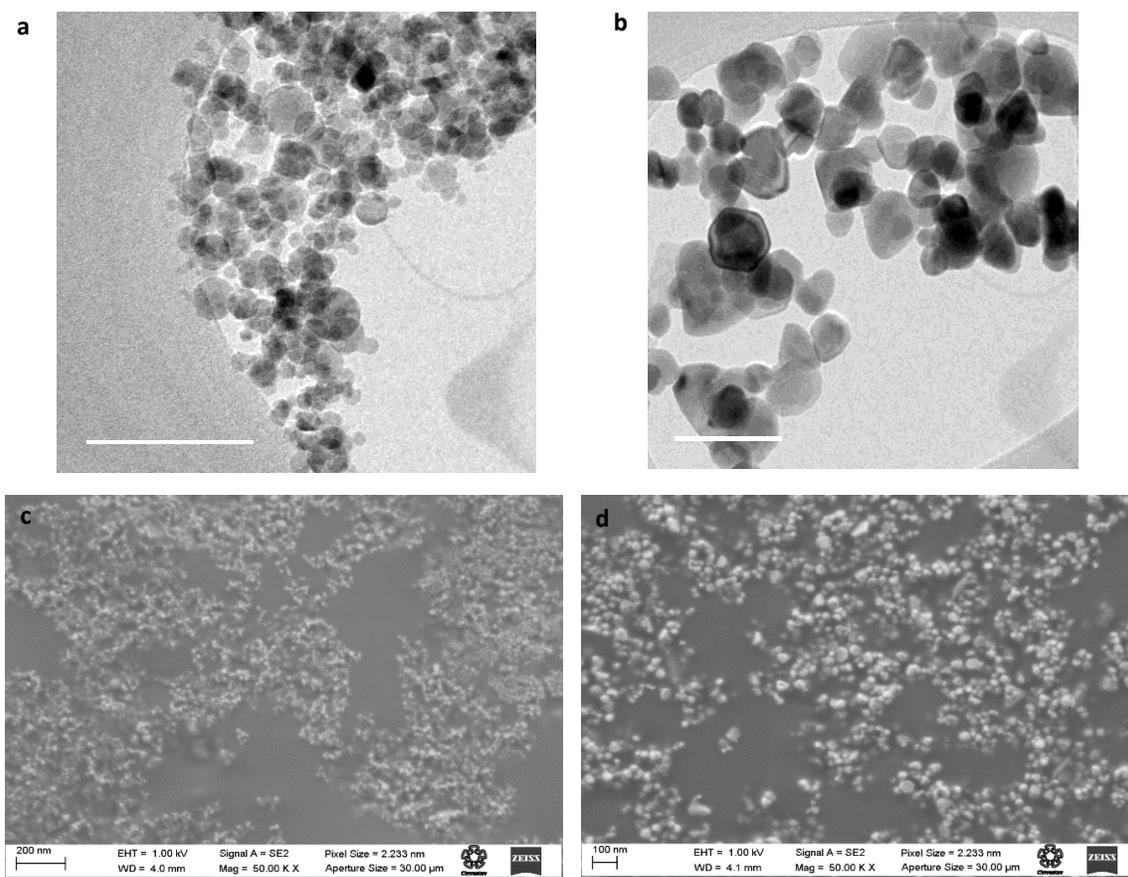


Figura 11. Morfología de las NP de TiO_2 y ZnO mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM). Las NP fueron analizadas mediante TEM y SEM para determinar su morfología y tamaño. Se muestran micrografías representativas de las NP de TiO_2 en TEM (a) y en SEM (c), así como de NP de ZnO en TEM (b) y SEM (d). nm, nanómetros.

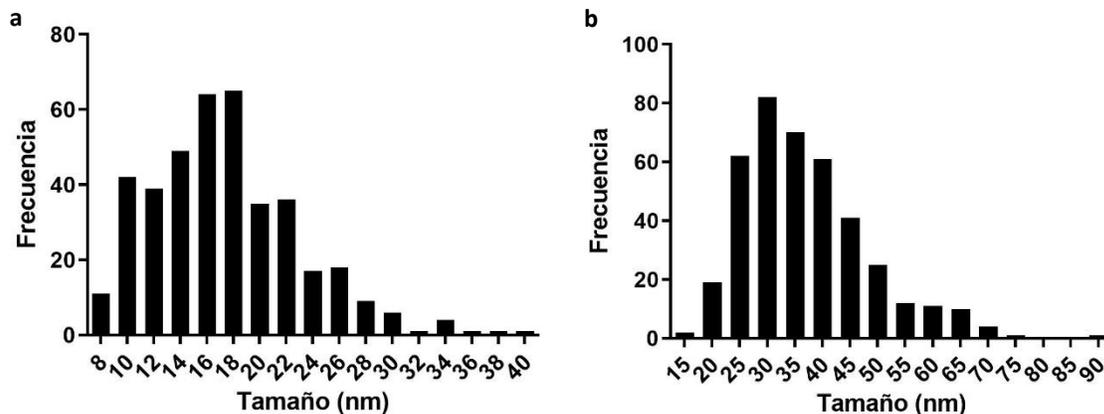


Figura 12. Distribución de tamaño de las nanopartículas (NP) de TiO₂ y ZnO. Distribución de tamaños de las NP de TiO₂ (a) y de ZnO (b). El tamaño de las NP se obtuvo con el uso del programa *Digital Micrograph*, midiendo al menos 400 NP de micrografías de TEM. nm, nanómetros.

3.1.3 Dispersión de las NP

Se estableció un protocolo de sonicación con la finalidad de evitar la formación de aglomerados. Las NP se suspendieron en dd-H₂O (500 µg/mL) y se realizó una sonicación a diferentes tiempos (10, 90, 180 y 300 seg) para elegir el tiempo en el que se observara un menor DH y PDI. Para las NP de TiO₂ se observó una disminución en el DH (~125 nm), así como un PDI menor a 0.5 después de 180 seg de sonicación (figura 13a). Para las NP de ZnO se obtuvo una disminución en el DH y menor PDI desde los 90 seg de sonicación (figura 13c). Por lo anterior, 180 y 90 seg de sonicación fueron elegidos para las NP de TiO₂ y ZnO, respectivamente. Se muestran las curvas de distribución para las NP de TiO₂ (Figura 13b) y de ZnO (Figura 13d) a los tiempos elegidos, las cuales indican una distribución uniforme y estrecha del DH de ambas NP. Después de este protocolo de sonicación se tomaron los volúmenes necesarios para agregar al medio de cultivo y llevar a las concentraciones requeridas para los experimentos de exposición de folículos antrales.

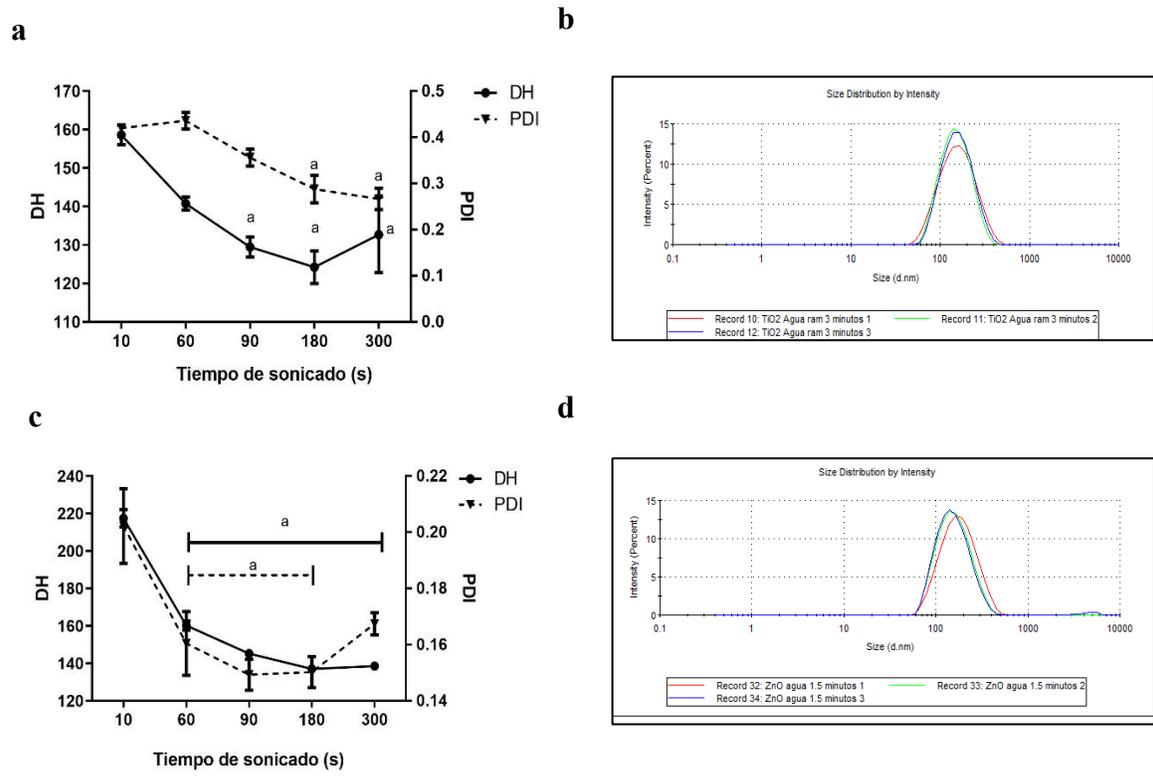


Figura 13. Efecto del tiempo de sonicación sobre el tamaño hidrodinámico (DH) y el índice de polidispersión (PDI) de las NP de TiO₂ y ZnO. Se prepararon soluciones stock (500 µg/mL) de cada NP en dd-H₂O y después se sometieron a sonicación en punta a diferentes tiempos. Se determinó el DH y el PDI a diferentes tiempos (a y c). Cada punto representa la media ± EE de 3 experimentos independientes. Las “a” sobre la línea indica una diferencia significativa respecto a 10 seg de sonicación. Se muestran curvas representativas de la distribución de tamaño para las NP de TiO₂ (b) y ZnO (d) después de 180 y 90 seg, respectivamente. a denota diferencia significativa comparado con 10 seg de acuerdo a la prueba ANOVA de una vía y la prueba *pos hoc* Bonferroni para TiO₂ ($F_{(4,55)} = 6.87$; $p < 0.0001$) y para ZnO ($F_{(4,40)} = 147.1$; $p < 0.0001$).

3.1.4 Caracterización fisicoquímica de las NP en el medio de cultivo

Dado que el DH, PDI y carga de superficie pueden ser influenciados por el medio en el que se encuentran, decidimos caracterizar a las NP en las distintas concentraciones y tiempos de exposición de este estudio. Después de 96 h de exposición y conforme al aumento de la concentración de NP de TiO₂, se observó un ligero incremento en el DH, el cual pasó de 133.6 nm en la concentración de 5 µg/mL a 182.4 nm en la concentración de 50 µg/mL (figura 14). El PDI se mantuvo por debajo de 0.5 (0.2 – 0.3) y la carga de superficie estuvo

entre -16 y -13 mV. Lo anterior sugiere la formación de agregados y/o aglomerados en el medio de cultivo, así como una distribución de tamaño estrecha y uniforme. Por otro lado, las NP de ZnO mostraron un DH que pasó de 133 a 70 nm en las concentraciones de 5 y 15 $\mu\text{g/mL}$, así como un PDI que incrementó de 0.195 a 0.574 (figura 14), sugiriendo una disminución en el tamaño y una distribución de la población de NP mayor conforme aumenta la concentración, así como la posible disolución de algunas NP. El valor observado para la carga de superficie en ambas NP sugiere una fuerza pobre de repulsión de las NP en el medio de cultivo y efectos modestos de aglomeración/agregación en el medio de cultivo. Sin embargo, los valores obtenidos son aceptables para la evaluación toxicológica de los materiales.

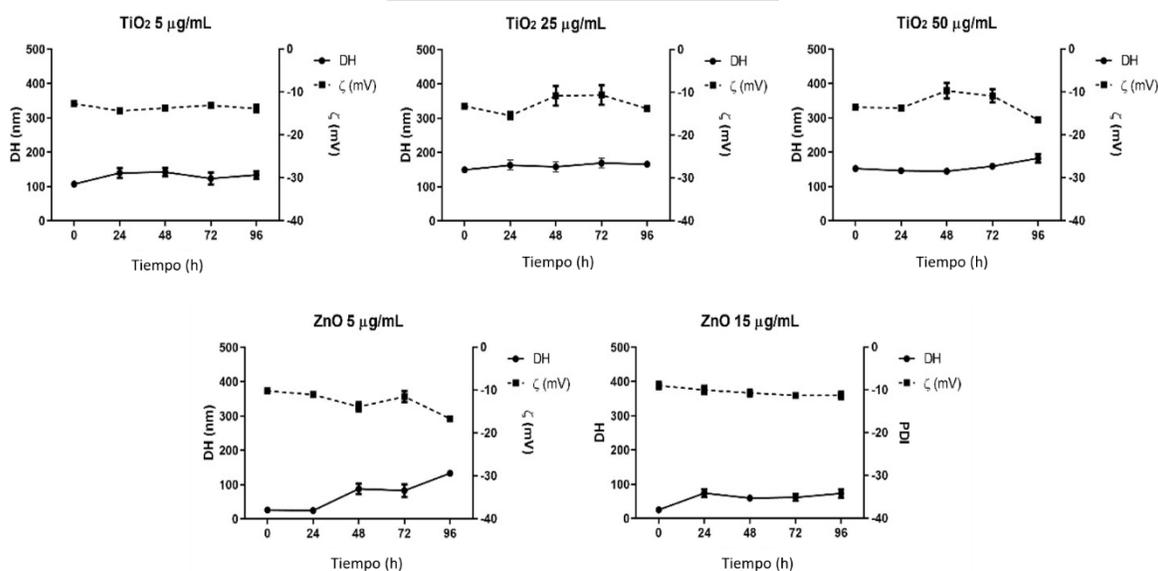


Figura 14. Estabilidad de las suspensiones de nanopartículas en el medio de cultivo. Las nanopartículas se suspendieron en el medio de cultivo para obtener las concentraciones finales de trabajo. Se evaluó el tamaño hidrodinámico (DH), y el potencial zeta (ζ) cada 24 h durante 96 h para comprender el tiempo de exposición del cultivo. Cada punto representa la media \pm el error estándar de 3-5 experimentos independientes.

3.2 Interacción de NP con el folículo antral

En este apartado se presentan los resultados sobre la evaluación de la actividad metabólica folicular, el diámetro o crecimiento del folículo, la alteración en la morfología folicular, el arreglo del citoesqueleto, así como el potencial papel protector del antioxidante trolox (Tx) en la exposición a las NP en algunos de estos efectos. Además, se evaluó la internalización y localización de ambas NP en los folículos antrales y sus efectos sobre la organización ultraestructural del folículo antral. Todo lo anterior, como parte de un estudio para conocer la interacción NP-folículo antral en un sistema *in vitro* y sus posibles efectos. En general, se siguió el diseño experimental de la figura 7 para la realización de los experimentos. Teniendo en cuenta que las características de las NP influyen sobre los efectos adversos, en esta sección se muestran los resultados de las dos NP a manera de comparativo.

3.2.1 Actividad metabólica

En este estudio se empleó el ensayo de MTT para evaluar la actividad metabólica de los folículos antrales expuestos a diferentes concentraciones de las NP de TiO₂ y ZnO. Las concentraciones de NP se eligieron de acuerdo con otros estudios que han evaluado sus efectos en distintos tipos celulares (George y cols., 2010; Xia y cols., 2008). La actividad metabólica se evaluó a las 48, 72 y 96 h. Las NP de TiO₂ no afectaron este parámetro a ninguna concentración o tiempo evaluado (figura 15 panel superior), mientras que las NP de ZnO a la concentración de 15 µg/mL disminuyeron la actividad metabólica a las 48 h pero no a las 72 h ni a las 96 h (figura 15, panel inferior). Por otro lado, la exposición a las NP de ZnO a la concentración más alta (25 µg/mL) afectó la actividad metabólica de los folículos

en todos los tiempos evaluados, sugiriendo una mayor toxicidad. Por lo anterior, esta concentración fue descartada de las evaluaciones posteriores.

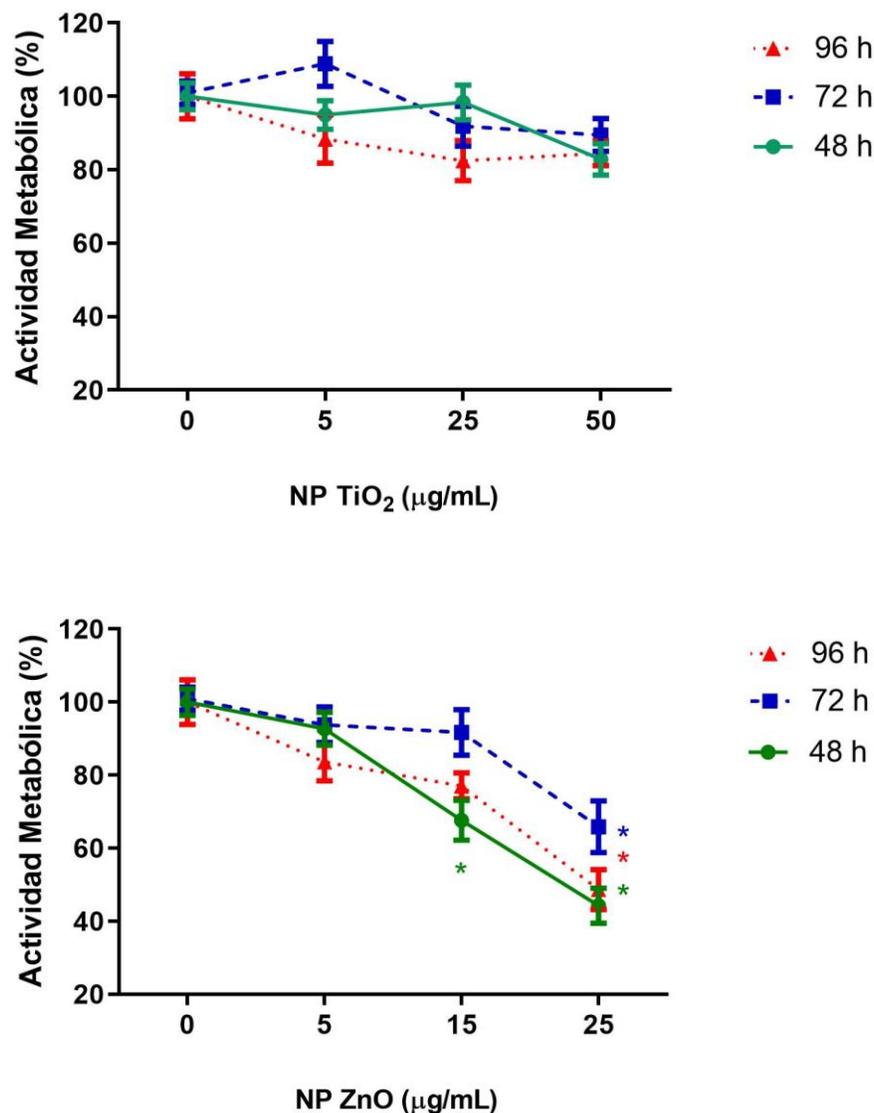


Figura 15. Efecto de las NP de TiO₂ y ZnO sobre la viabilidad folicular. Folículos antrales fueron cultivados y expuestos a diferentes concentraciones de NP de TiO₂ y ZnO. La actividad metabólica se evaluó a las 48, 72 y 96 h de exposición mediante el ensayo de reducción del MTT. Los datos se normalizaron respecto al control y se presentan como la media ± EE de al menos 10 folículos por grupo en 3 experimentos independientes. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de cada tiempo, de acuerdo a la prueba ANOVA de una vía y la prueba *posthoc* de Dunnett para TiO₂ ($F_{(3,114)} = 4.69$; $p < 0.004$) y para ZnO ($F_{(3,322)} = 45.76$; $p < 0.0001$).

3.2.2 Efecto de las NP sobre el diámetro folicular

Al evaluar el crecimiento folicular mediante la determinación de su diámetro observamos efectos opuestos para cada NP. Por un lado, la exposición a las NP de TiO₂ indujo un incremento en el diámetro folicular desde las 48 h, el cual se mantuvo hasta las 96 h en la concentración más alta (figura 16). La concentración intermedia de esta NP también indujo un incremento en el diámetro a partir de las 72 h, mientras que la concentración más baja no tuvo efecto sobre este parámetro (figura 16). Por otro lado, y contrario a lo observado con las NP de TiO₂, la concentración más alta de NP de ZnO (15 µg/mL) indujo una disminución en el diámetro folicular a las 24 y 48 h. Sin embargo, este efecto no se mantuvo, ya que a las 72 h no se observó diferencia respecto al control (figura 16). La concentración más baja de NP de ZnO no tuvo ningún efecto sobre el diámetro folicular. Estos resultados sugieren un daño o efecto temprano-temporal de las NP de ZnO con la concentración alta, mientras que para las NP de TiO₂ el efecto sobre el diámetro folicular parece depender de la concentración, así como del tiempo de exposición.

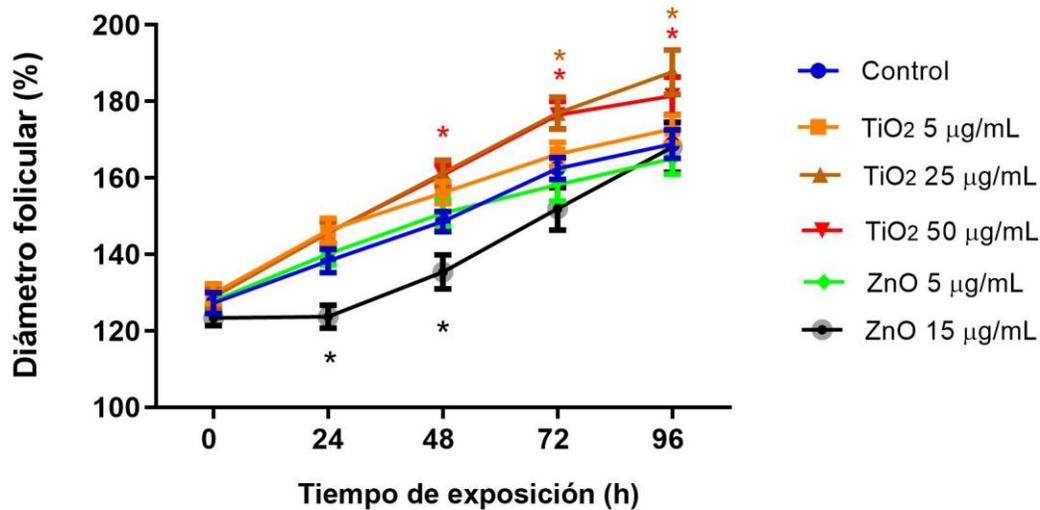


Figura 16. Efecto de las NP de TiO₂ y ZnO sobre el diámetro folicular. Folículos antrales fueron cultivados individualmente, el diámetro folicular se midió en periodos de 24 h y se reportó como porcentaje de cambio. En el día 3 de cultivo, se agregaron las NP de TiO₂ (5, 25 y 50 µg/mL) y de ZnO (5 y 15 µg/mL) y se mantuvo el cultivo por 96 h. Los puntos representan la media ± EE de 12-15 folículos por grupo de tratamiento en 3 experimentos independientes. * denota diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control en el mismo tiempo. Se empleó ANOVA de dos vías y la *posthoc* Dunnett ($F_{(5,237)} = 5.76$; $p < 0.0001$).

3.2.3 Papel del trolox sobre el efecto de las NP en el diámetro y morfología folicular

La toxicidad de las NP, en particular las metálicas, se ha asociado con su capacidad para generar o inducir la formación de ROS en sistemas biológicos, afectando el balance oxidoreductor (redox) de las células. Con la intención de determinar indirectamente si las NP utilizadas generan ROS y si éstas pueden estar participando en los efectos de los nanomateriales empleados, decidimos evaluar el diámetro folicular y otros parámetros generales usando NP solas y en co-exposición con el antioxidante Tx.

Primero, evaluamos el efecto de varias concentraciones de Tx sobre el diámetro folicular. Elegimos varias concentraciones (25, 50, 75 y 100 µM) que se probaron para determinar si

afectaba por sí mismo el crecimiento folicular. Dado que no observamos ninguna alteración en este parámetro con ninguna de las concentraciones evaluadas (figura 17), decidimos utilizar la concentración más alta del antioxidante para las evaluaciones de la co-exposición.

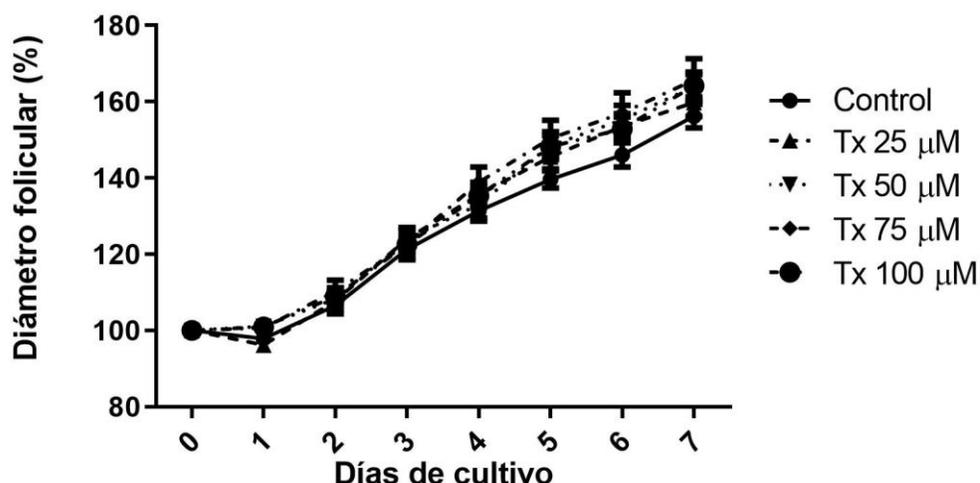
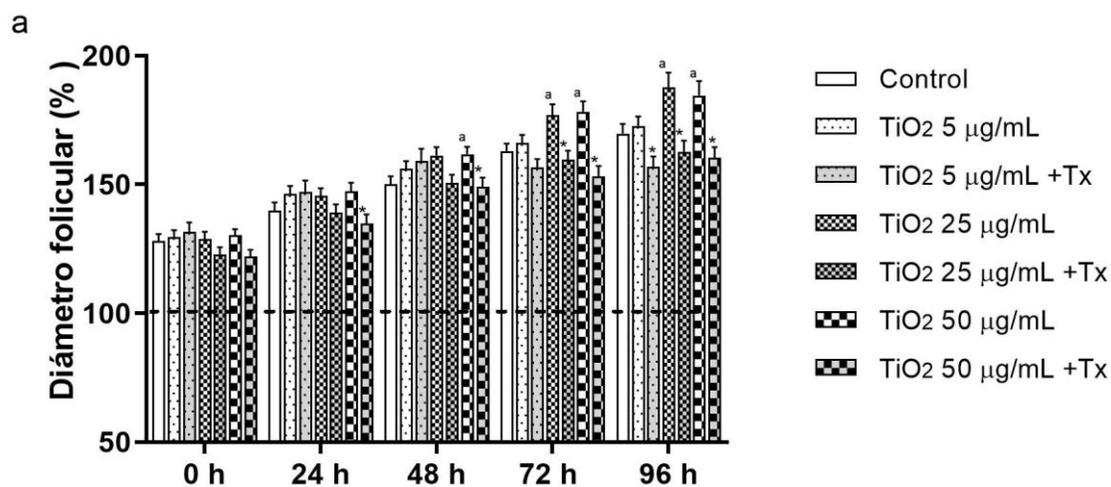


Figura 17. Efecto del trolox sobre el diámetro folicular. Folículos antrales fueron cultivados usando diferentes concentraciones de trolox (25, 50, 75 y 100 µM). El diámetro folicular se registró cada 24 h en micrómetros y se reportó como porcentaje de cambio. Los datos se presentan como la media \pm EE de 12 a 15 folículos por grupo en al menos 3 experimentos independientes. No se encontró diferencia significativa de acuerdo a la prueba de ANOVA de 2 vías. Tx: trolox.

Como ya se comentó, se observó un incremento respecto al control en el diámetro folicular a partir de las 48 h con la concentración más alta (50 µg/mL) y a partir de las 72 h con la concentración intermedia (15 µg/mL) de NP de TiO₂ respecto al control. Este efecto no se observó en presencia de Tx, ya que el diámetro de los folículos expuestos a las NP de TiO₂ no cambió significativamente respecto al grupo control en ninguno de los tiempos evaluados (figura 18a). Este efecto sugiere un papel protector del Tx ante el daño inducido por esta NP, y que el efecto puede ser mediado por el estrés oxidante. Cuando se realizó la co-exposición de las NP de ZnO + Tx, se observó incapacidad de los folículos para crecer durante todo el tiempo del cultivo (figura 18b). Lo anterior sugiere un efecto tóxico potenciado por la co-

exposición, ya que la NP por si sola tiene un efecto temporal (a las 24 y 48 h solamente). Lo anterior sugiere que el efecto observado con NP de ZnO no se relaciona con la inducción de estrés oxidante o que, de estar relacionado, el efecto es potenciado por el antioxidante, impidiendo así la “recuperación” que se observó con sólo la NP. En general, las NP de TiO₂ inducen el incremento del diámetro folicular, mientras que la co-exposición con Tx revierte dicho efecto. Por otro lado, la exposición a NP de ZnO induce una disminución temporal en el diámetro folicular (24 y 48 h), mientras que la co-exposición con Tx no muestra esa recuperación del efecto, evidenciado por la falta de incremento en el diámetro folicular, potenciando el efecto o daño inducido por las NP de ZnO.



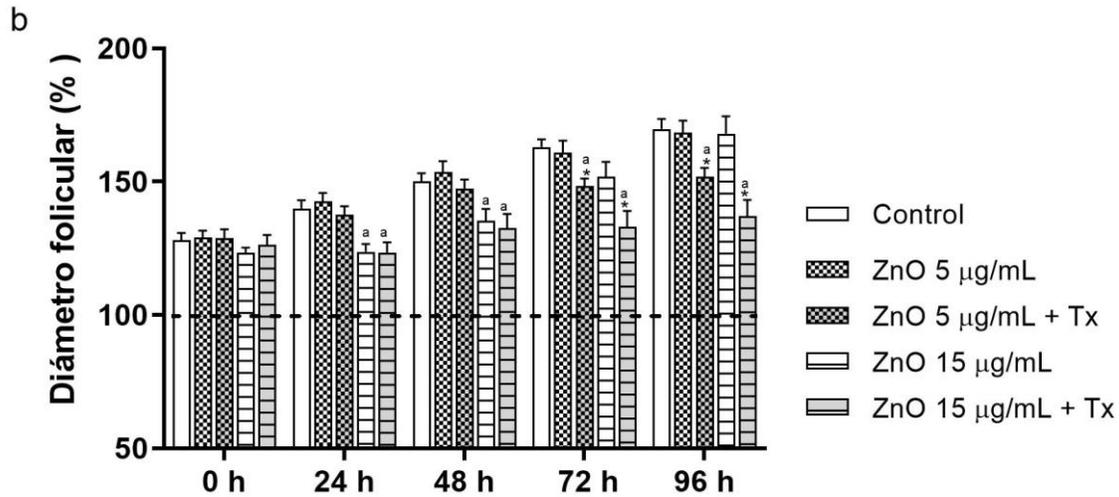


Figura 18. Efecto del trolox sobre la alteración en el diámetro folicular inducida por las NP de TiO₂ y de ZnO. Folículos antrales se cultivaron a diferentes concentraciones de NP solas o en co-exposición con trolox. El crecimiento folicular se evaluó durante los 7 días del cultivo y se reportó como porcentaje de cambio en el tiempo. Se muestran los datos desde el día 3 de cultivo (hora 0 de exposición), el crecimiento se evaluó desde el día 0 del cultivo. Cada barra representa la media \pm EE de 12-15 folículos por grupo en 3 experimentos independientes. ^a Indica diferencia significativa respecto al control en el mismo tiempo evaluado. * Indica diferencia significativa debido a la co-exposición con Tx dentro de la misma concentración de NP de acuerdo a la prueba ANOVA de dos vías y a la prueba *posthoc* Dunnet para TiO₂ ($F_{(6,278)} = 6.87$; $p < 0.001$) y para ZnO ($F_{(4,198)} = 5.76$; $p < 0.001$). La línea punteada indica el valor (100%) de diámetro folicular en el día 0 de cultivo ($p < 0.05$). Tx: trolox.

Cuando analizamos el efecto de las NP de TiO₂ sobre la morfología del folículo antral, observamos una desorganización del folículo que fue más evidente con la concentración más alta (50 µg/mL), sugiriendo un efecto dependiente de la concentración. La co-exposición con Tx parece mitigar el efecto de estas NP sobre la morfología (figura 19). Por otro lado, la exposición a las NP de ZnO indujo retracción celular, que se puede apreciar en las células de la orilla del folículo y que normalmente tienden a formar una monocapa sobre el plato. La co-exposición con Tx no tuvo un efecto notable sobre la retracción inducida por las NP solas (figura 20). Estas observaciones, de nuevo, sugieren que el Tx tiene un papel protector en el efecto de las NP de TiO₂, mientras que para las NP de ZnO sugiere incapacidad del antioxidante para proteger del daño o un efecto tóxico potenciado.

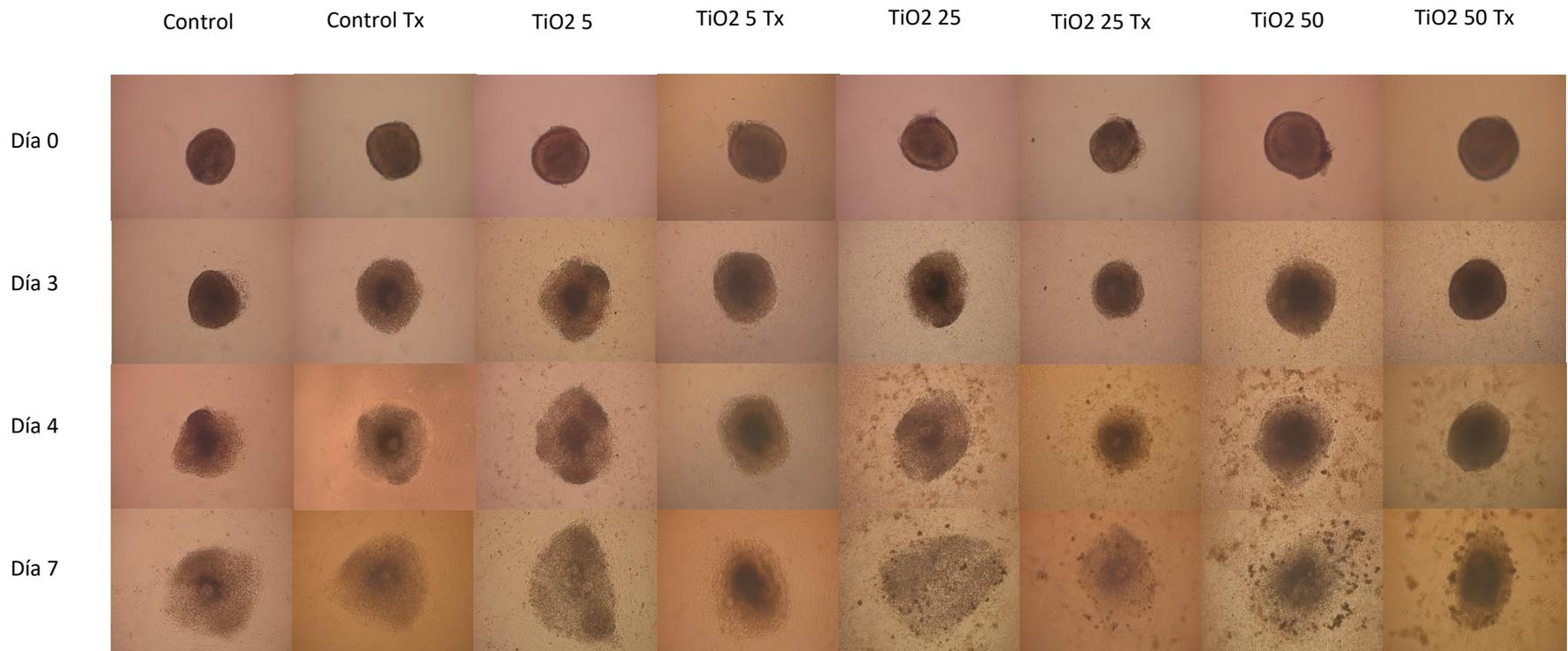


Figura 19. Efecto de la exposición a las NP de TiO₂ y la co-exposición con trolox sobre la morfología folicular. Folículos antrales se cultivaron y diariamente se tomaron micrografías que se analizaron para determinar la morfología folicular desde el día 0 de cultivo hasta el día 7. La exposición a las NP inició el día 3 del cultivo. Magnificación: 20x.

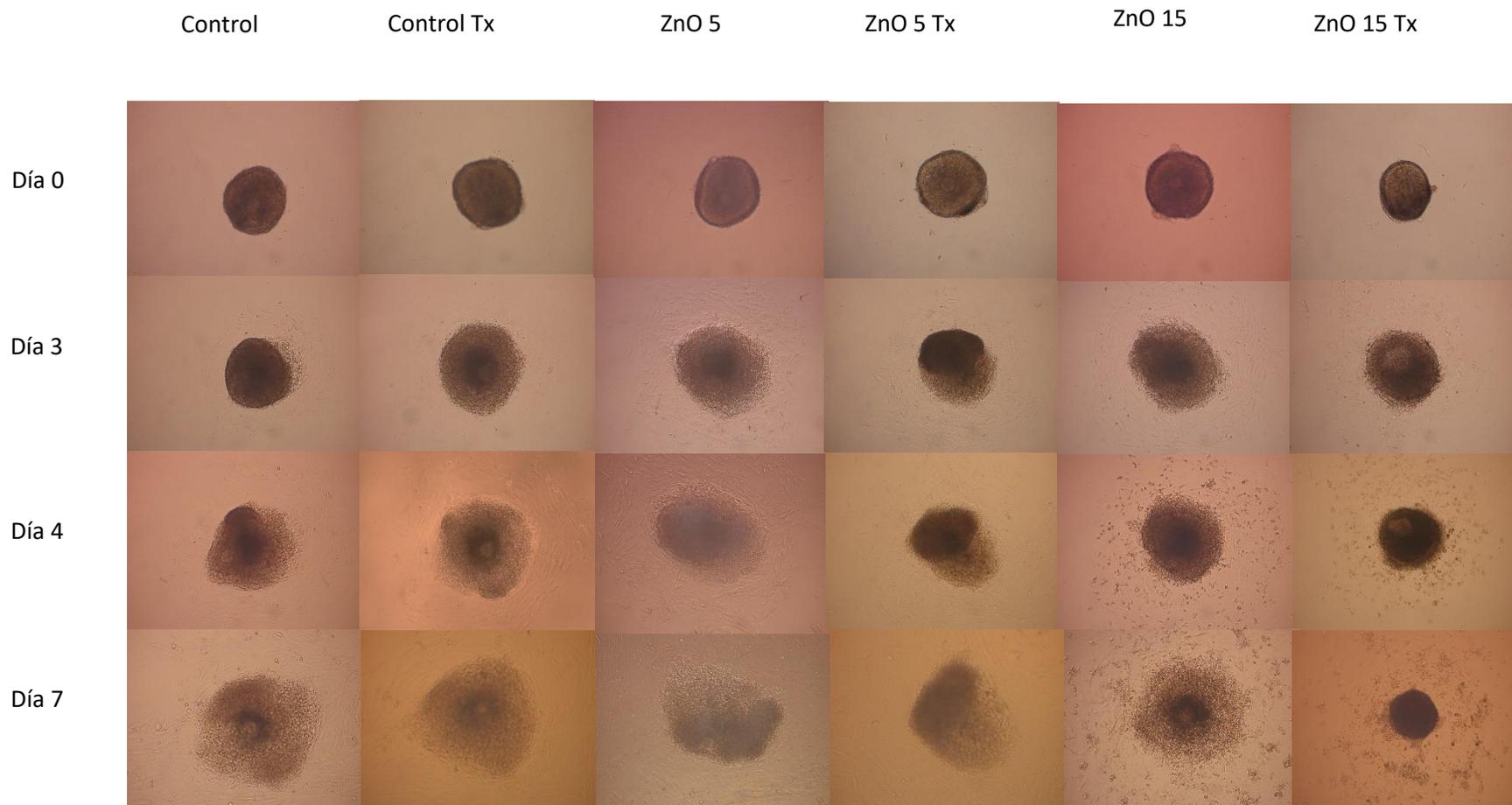


Figura 20. Efecto de la exposición a las NP de ZnO y la co-exposición con trolox sobre la morfología folicular. Folículos antrales se cultivaron y diariamente se tomaron micrografías que se analizaron para determinar la morfología folicular desde el día 0 de cultivo hasta el día 7. La exposición a las NP inició el día 3 del cultivo. Magnificación: 20x.

3.2.4 Efecto de las NP sobre el arreglo del citoesqueleto

Teniendo en cuenta que los resultados anteriores evidencian una alteración en la morfología de los folículos antrales después de ser expuestos a las NP de TiO₂ o ZnO, decidimos realizar un análisis por inmunofluorescencia con el fin de determinar si el efecto previamente observado podría estar relacionado con una alteración en el arreglo del citoesqueleto. Se sabe que las estructuras del citoesqueleto contribuyen a la forma y organización celular (*Microtubules, Filaments / Learn Science at Scitable*, s. f.) y existe evidencia de que algunos nanomateriales afectan la organización del citoesqueleto (Gheshlaghi y cols., 2008; Ispanixtlahuatl-Meráz y cols., 2018). Además, se determinó si la co-exposición con Tx modificaba el efecto inducido por las NP solas después de 96 h de exposición. Lo anterior nos permitió continuar la exploración sobre la posible participación del estrés oxidante, ahora en este efecto. El análisis de la inmunofluorescencia de las células de la teca muestra “haces” de microtúbulos (α -tubulina) irradiando desde la región nuclear hacia la periferia de la célula, así como una distribución relativamente uniforme de filamentos paralelos de haces de actina (F-actina) en el citoplasma de células control (figura 21). Sin embargo, el grupo expuesto a las NP de TiO₂ mostró alteraciones, evidenciadas principalmente por la presencia de “agujeros” en el arreglo de los microtúbulos, así como por la desorganización en el arreglo de los filamentos de actina (figura 21a). Dichas alteraciones fueron prevenidas en el grupo co-expuesto a Tx, sugiriendo que la alteración se relaciona con la inducción de estrés oxidante (figura 21a). Cuando se analizó el efecto de las NP de ZnO, se encontró que inducían alteraciones como la presencia de “agujeros” en el arreglo de los microtúbulos en la concentración más baja evaluada (5 μ g/mL), mientras que en la concentración más alta (15 μ g/mL) se observó un acortamiento en los microtúbulos irradiando a la periferia (figura 21b).

Los filamentos de actina mostraron una desorganización, evidenciada por la apariencia ondulatoria en vez de fibras paralelas. Estas alteraciones inducidas por las NP de ZnO no fueron protegidas o prevenidas por la co-exposición con Tx (figura 21b). Lo anterior sugiere la incapacidad del antioxidante para proteger el daño inducido por las ZnO NP.

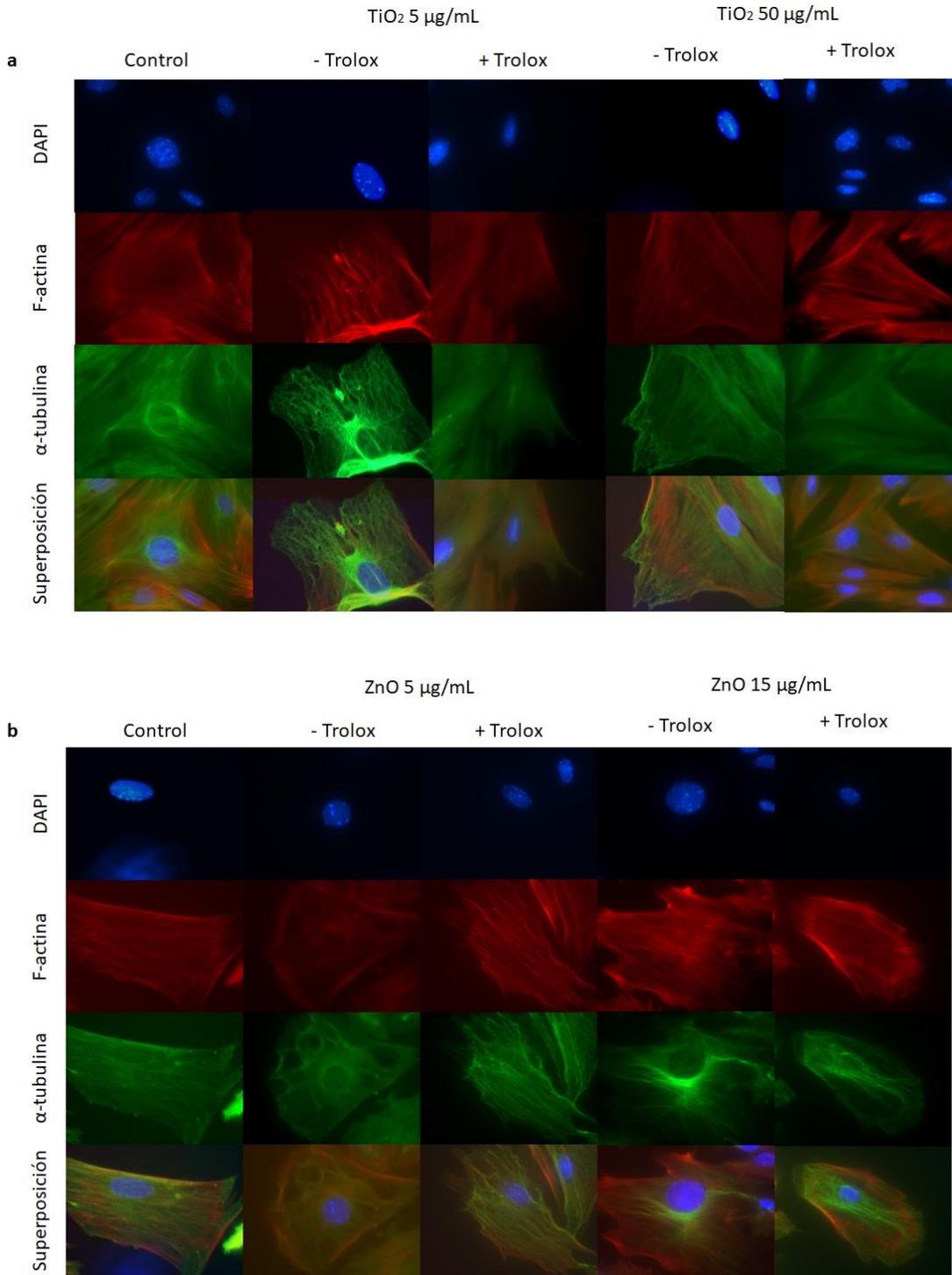


Figura 21. Efecto de las NP de TiO₂ y ZnO sobre la organización del citoesqueleto y papel del trolox. Folículos antrales se expusieron a NP de TiO₂ y ZnO solos o en co-exposición con trolox y después se procesaron para inmunofluorescencia. Se evaluó α-tubulina y F-actina en células de la teca. Se muestran micrografías representativas del efecto inducido por ambas NP solas y en co-exposición con trolox. Se usó DAPI para teñir el núcleo.

3.2.5 Internalización y localización de las NP en el folículo antral

Para este estudio se decidió evaluar la internalización y localización de las NP en el folículo antral, así como las potenciales vías de ingreso, ya que no han sido previamente descritas en el folículo. La evaluación de las vías de ingreso es importante debido a que influyen en la localización intracelular y que pueden influir en la toxicidad de las NP. Además, este análisis nos permitiría saber si el folículo puede servir como barrera física de protección al ovocito, evitando que estas NP lleguen a la célula germinal.

Después de la exposición a las NP de TiO₂ (50 µg/mL) durante 96 h observamos que éstas ingresan al espacio intercelular dentro del folículo antral (figura 22B) y también a las células, formando principalmente aglomerados/agregados (figura 22D y 22G). También observamos un gradiente de concentración de NP en el folículo. Las células de la teca presentaron una mayor cantidad de NP, mientras que las CG mostraron menos NP. Por su parte, las CC (células en contacto y comunicación directa con el ovocito) presentaron muy pocas NP. En general, las NP se observaron mayormente dentro de vesículas (figura 22D) pero también como NP “libres” en el citoplasma, cercanas a organelos como las mitocondrias (figura 22f). Algunas NP fueron observadas en gotas lipídicas dentro de las células de la cúmula (figura 22i y 22J). Las células foliculares del grupo control se muestran en la figura 22A (teca), 22E (granulosa) y 22H (cúmula).

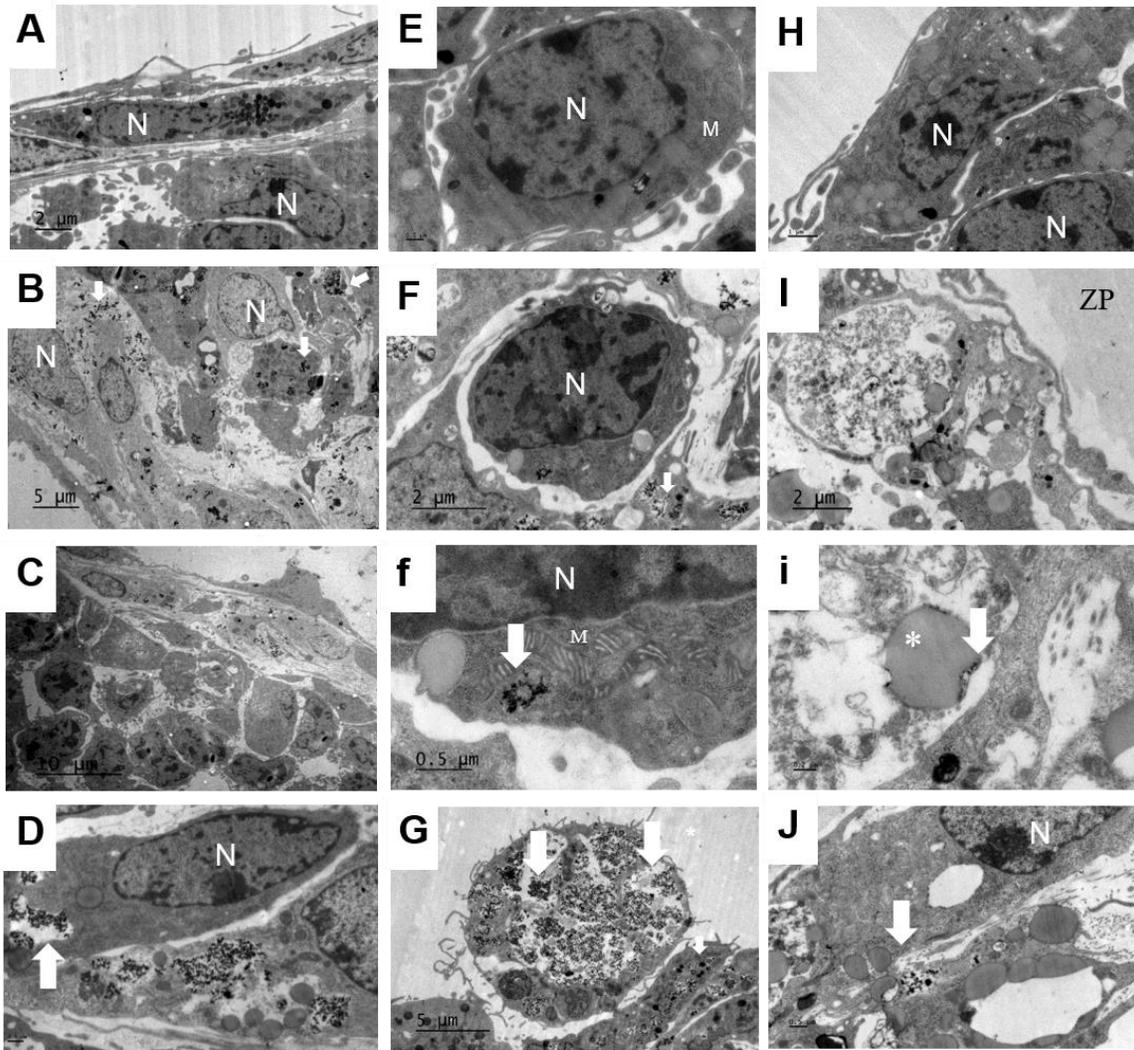


Figura 22. Análisis de la internalización de las NP de TiO₂ en el folículo antral. Folículos antrales se expusieron 96 h a NP de TiO₂ y después fueron procesados para TEM. Se muestran micrografías representativas de las células de la teca (A), granulosa (E) y cumula (H) del grupo control, así como células de la teca (B, C y D), granulosa (F, f y G) y cumula (I, i y J) de folículos antrales expuestos a TiO₂ NP. N: núcleo, M: mitocondria, *: gotas lipídicas, ZP: zona pelúcida. Las flechas señalan algunas NP

El ingreso de las NP al folículo antral puede involucrar varias vías. De acuerdo con el análisis que se realizó, participan vías no fagocíticas como la endocitosis mediada por clatrina y caveolinas, evidenciado por la formación de vesículas e invaginaciones en la membrana celular en regiones donde hay NP presentes (figuras 23A, 23B y 23C). La macropinocitosis es otra vía involucrada en la internalización de las NP ya que se observó la formación de

protrusiones, que después forman vesículas grandes conocidas como macropinosomas (figura 23D), que se ha descrito pueden fusionarse con los lisosomas (Stern y cols., 2012).

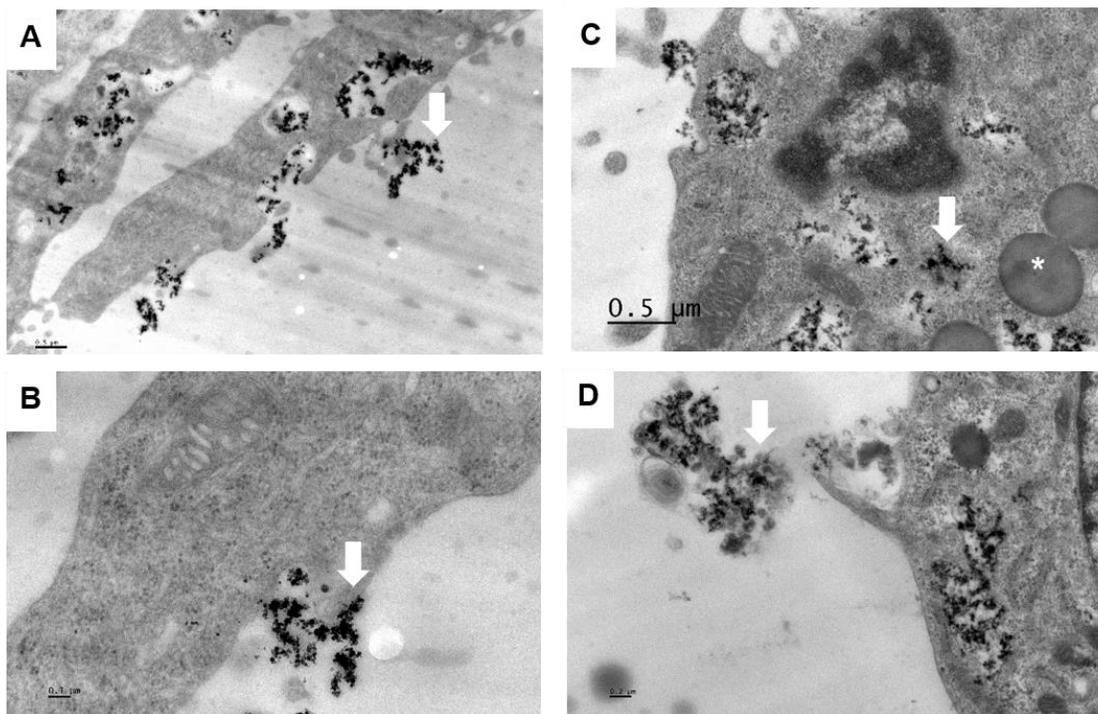


Figura 23. Vías de internalización de las NP de TiO₂ en el folículo antral. Folículos antrales expuestos durante 96 h a TiO₂ fueron procesados para TEM. Las flechas blancas indican la localización de las NP. * Gotas lipídicas. m, indica la presencia de mitocondrias.

Cuando analizamos las imágenes de TEM en el grupo expuesto a NP de ZnO (15 μg/mL) no se observó la presencia intrafolicular de estas NP (figura 24), lo que sugiere que se disuelven en el medio de cultivo. En la figura 24 se muestran micrografías representativas de la organización y localización de las células de la teca, granulosa y de la cúmula en el folículo antral.

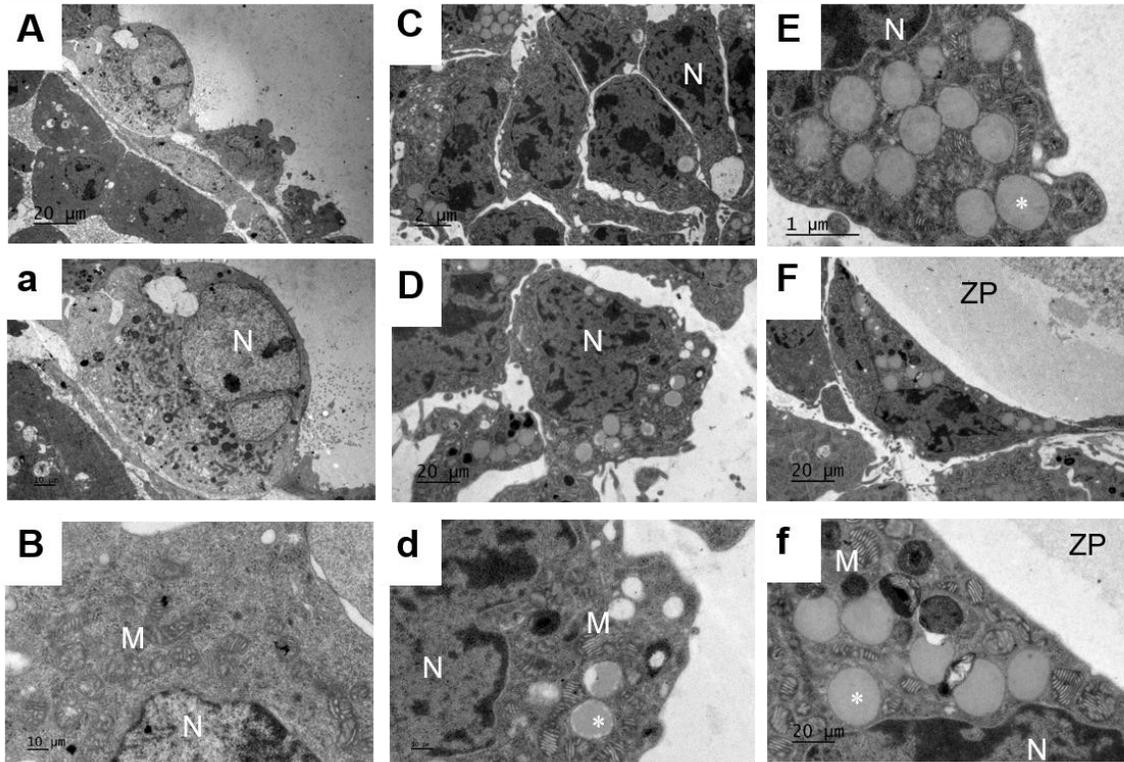


Figura 24. Análisis de la internalización de las NP de ZnO al folículo antral. Folículos antrales expuestos a ZnO (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron procesados para TEM. Se muestran micrografías representativas de las células de la teca (A y B), granulosa (C y D) y cumula (E y F) expuestas a NP, así como magnificaciones de células de la granulosa (d) y cumula (f). No se observa la presencia de las NP de ZnO en el folículo antral. N: núcleo, M: mitocondria, *: gotas lipídicas, ZP: zona pelúcida.

3.2.6 Disociación de las NP de ZnO en el medio de cultivo

Teniendo en consideración que el análisis de TEM no evidenció la presencia de NP de ZnO en los folículos antrales expuestos, y que se ha descrito la capacidad de disolución de estas NP (Xia y cols., 2008), se decidió evaluar si esto estaba pasando en el sistema de cultivo empleado en este estudio. Los resultados mostraron que las NP de ZnO suspendidas en agua fueron fácilmente observadas mediante TEM (figura 25B). Sin embargo, las NP de ZnO no se observaron claramente después de ser incubadas en el medio de cultivo (figura 25C), sugiriendo que estas NP se disuelven a las 96 h de incubación en el medio de cultivo. Se ha

descrito que las NP pueden adsorber proteínas en medios biológicos, formando estructuras de “corona de proteínas”, que puede ser caracterizada mediante distintos métodos (Docter y cols., 2014; Westmeier y cols., 2016). Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó el perfil de la corona de proteínas para así determinar la presencia de las NP durante el tiempo de cultivo. Si las NP de ZnO se disuelven durante el tiempo de cultivo, un perfil de proteínas más tenue o débil debe observarse después de la separación en un gel SDS-PAGE. Los resultados mostraron un perfil claro y bien definido de proteínas en el carril correspondiente a las NP de TiO₂. En cambio, se observó un perfil menos definido o más tenue en el carril correspondiente a las NP de ZnO (figura 25A). Notablemente, la incubación en el medio de cultivo para analizar el perfil de proteínas fue menor (30 min) que el tiempo de incubación para analizar mediante TEM (96 h), lo que sugiere que la disolución de estos materiales inicia desde las primeras horas de cultivo. Por ello, es posible que durante el tiempo de exposición haya internalización de NP al folículo como NP y como ion.

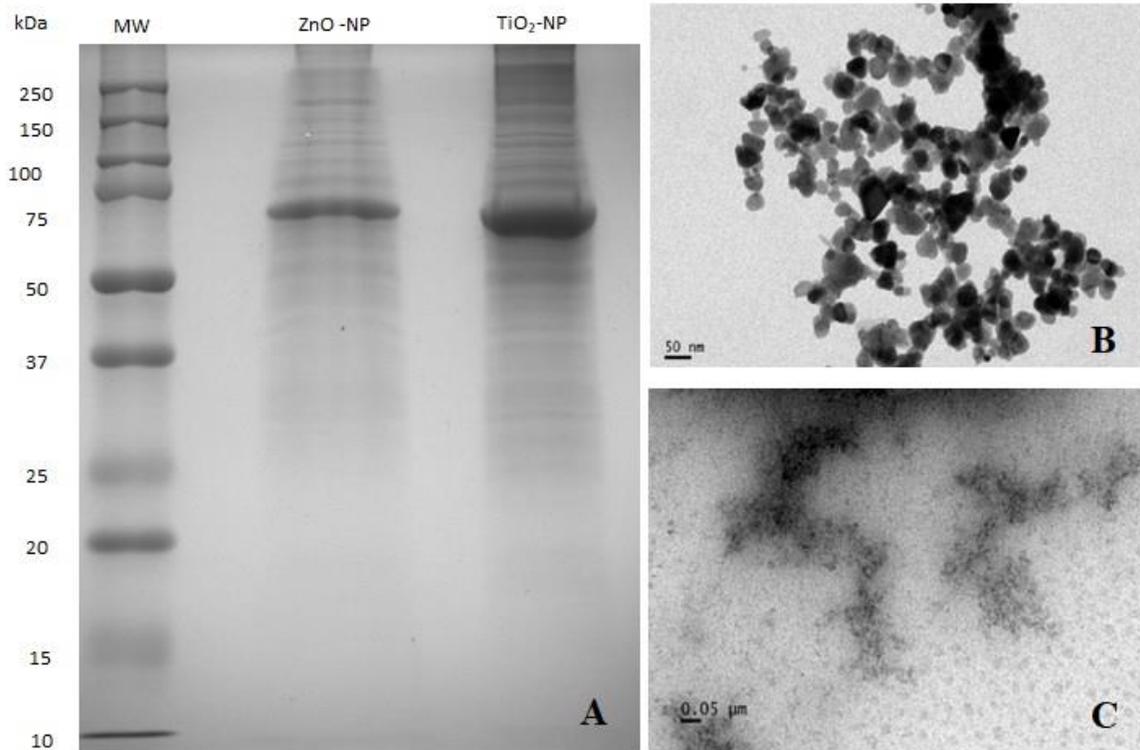


Figura 25. Disolución de las NP de ZnO en el medio de cultivo. NP de ZnO se suspendieron en agua o en medio de cultivo y se analizaron mediante TEM y se analizó el perfil de proteínas que conforma la corona de proteínas formada por incubación con el medio de cultivo. Se muestra el gel con el perfil de proteínas (A) y micrografías representativas de suspensiones en agua (B) y medio de cultivo (C), así como el gel con el perfil de proteínas (A).

3.2.7 Efecto de las NP sobre la ultraestructura del folículo antral

Para determinar si la exposición a estos nanomateriales es capaz de afectar la organización ultraestructural del folículo antral se realizó un análisis de las imágenes obtenidas mediante TEM. Las células de los folículos expuestos a las NP de TiO₂ mostraron una morfología normal (figura 22), mientras que algunas de las células de los folículos expuestos a las NP de ZnO mostraron forma circular (figura 24), posiblemente producto de la retracción celular inducida por estas NP. La exposición a las NP de TiO₂ muestra alteración en la membrana basal (que separa a las células de la teca de las células de la granulosa), evidenciado como la

pérdida de la continuidad de la misma y por la presencia de las NP en este espacio (figura 22B y 22C), comparado con el control (figura 22A) donde se observa continuidad de la membrana. También se observaron alteraciones en la ultraestructura de las mitocondrias por la exposición a ambas NP. Las mitocondrias de las células de los folículos control se observan con una membrana interna y externa bien definidas, así como crestas paralelas bien definidas y gránulos densos (figura 26C). Las mitocondrias de las células expuestas a ambas NP mostraron espacios intermembranales alargados y alineamiento no paralelo de las crestas (figuras 26E, F, H, I). Aunque no se observó la presencia de NP dentro del ovocito ni en la zona pelúcida que lo delimita, fue evidente la desaparición de las proyecciones citoplasmáticas que comunican a las CC y el ovocito (figuras 26D y G). Por su parte, el ovocito del grupo control mantuvo las proyecciones citoplasmáticas bien definidas (figura 26A). Estas proyecciones tienen un papel fundamental en la comunicación entre ambos tipos celulares, promoviendo la transferencia de factores de nutrición y otras moléculas importantes para la maduración del ovocito (Yokoo y Sato, 2004).

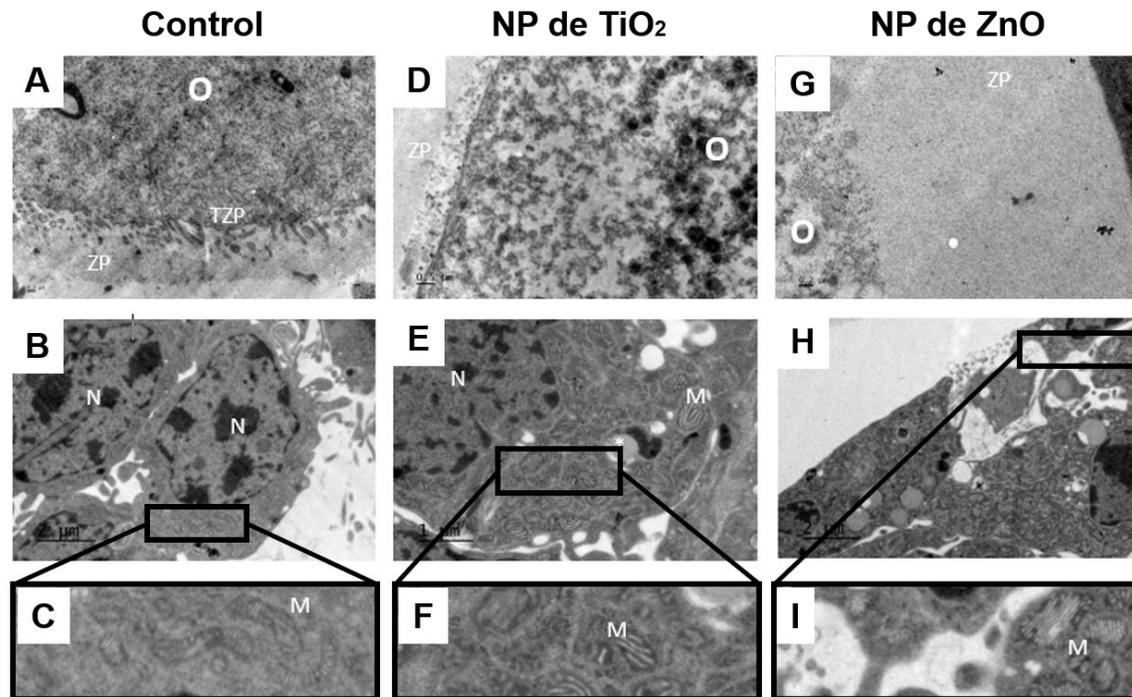


Figura 26. Análisis de la ultraestructura de folículos antrales expuestos a ambas NP. Folículos antrales expuestos durante 96 h a NP se procesaron para observar alteraciones ultraestructurales. Se muestran micrografías representativas del control (A, B y C), así como de los grupos expuestos a NP de TiO₂ (D, E, F) y a NP de ZnO (G, H, I). N: núcleo, M: mitocondria, O: oocito, ZP: zona pelúcida, TZP: proyecciones citoplasmáticas.

3.3 Efecto de las NP de TiO₂ sobre reguladores de apoptosis y del ciclo celular

Teniendo en cuenta las alteraciones observadas en parámetros como el diámetro, la morfología y ultraestructura del folículo antral por la exposición a las NP de TiO₂, que sugieren la posibilidad de inducción de apoptosis, se decidió evaluar si este material inducía apoptosis en los folículos antrales expuestos *in vitro*. A partir de aquí los resultados se presentan enfocados en los efectos de las NP de TiO₂ y las NP de ZnO por separado con la intención de mostrar un panorama general del efecto de cada NP en este proceso.

La expresión de *Bax* y *Caspasa 3* (*Cas 3*) no fue afectada por ninguna de las concentraciones empleadas en el estudio. Por otro lado, la concentración intermedia (15 $\mu\text{g/mL}$) causó una disminución en la expresión del gen antiapoptótico *Bcl2*, lo que incrementó la razón *Bax/Bcl2*. Lo anterior sugiere que esta concentración fue capaz de inducir apoptosis en los folículos antrales (figura 27).

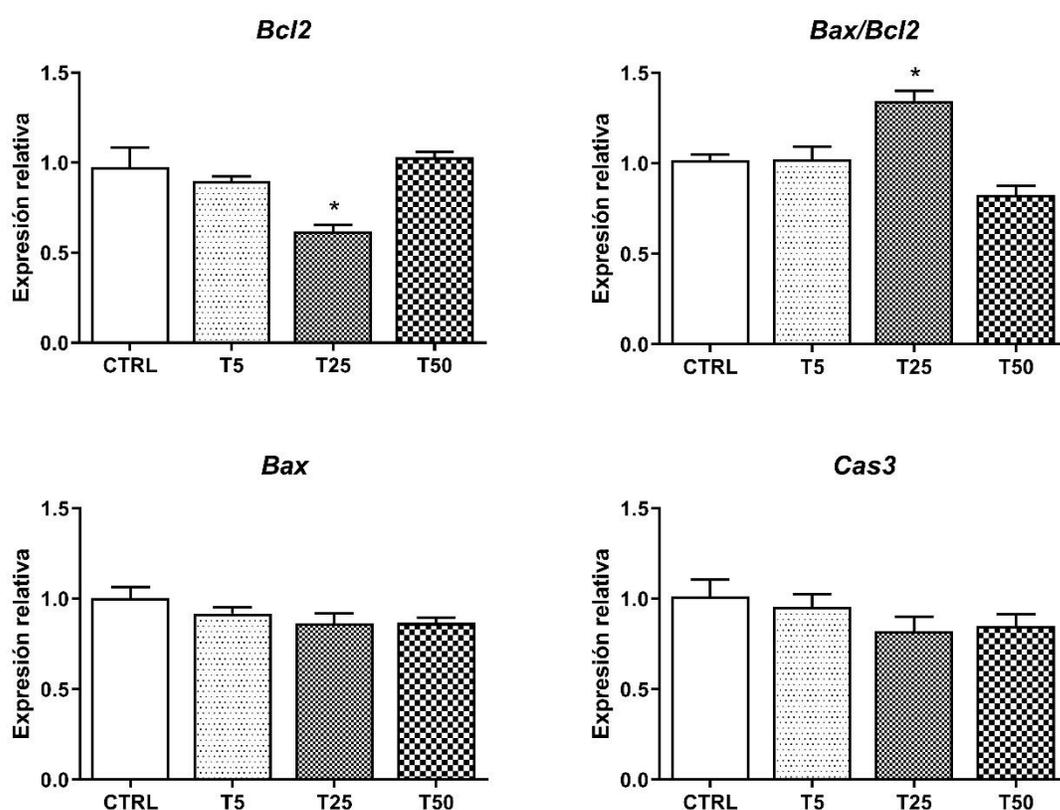


Figura 27. Efecto de las NP de TiO_2 sobre la expresión de enzimas apoptóticas. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de NP de TiO_2 . Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión génica de proteínas implicadas en la apoptosis. El asterisco (*) indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *pos hoc* Dunnet (*Bcl2*; $F_{(3,12)} = 9.21$; $p < 0.01$, *Bax/Bcl2*; $F_{(3,12)} = 16.70$; $p < 0.001$). T5 = TiO_2 5 $\mu\text{g/mL}$, T25 = TiO_2 25 $\mu\text{g/mL}$, T50 = TiO_2 50 $\mu\text{g/mL}$.

Dado que observamos un incremento en el diámetro folicular, y considerando que la proliferación celular de las células del folículo antral promueve el crecimiento del mismo, se

decidió evaluar la expresión génica de proteínas del ciclo celular para explorar si el efecto de las NP de TiO₂ sobre el diámetro se relacionaba con alteraciones en el ciclo celular. Ninguna de las concentraciones utilizadas afectó la expresión de las proteínas evaluadas (figura 28), sugiriendo que esta exposición no altera el ciclo celular de las células del folículo, y por lo tanto, que el efecto sobre la morfología que se observó previamente no se debe a una alteración en el ciclo celular.

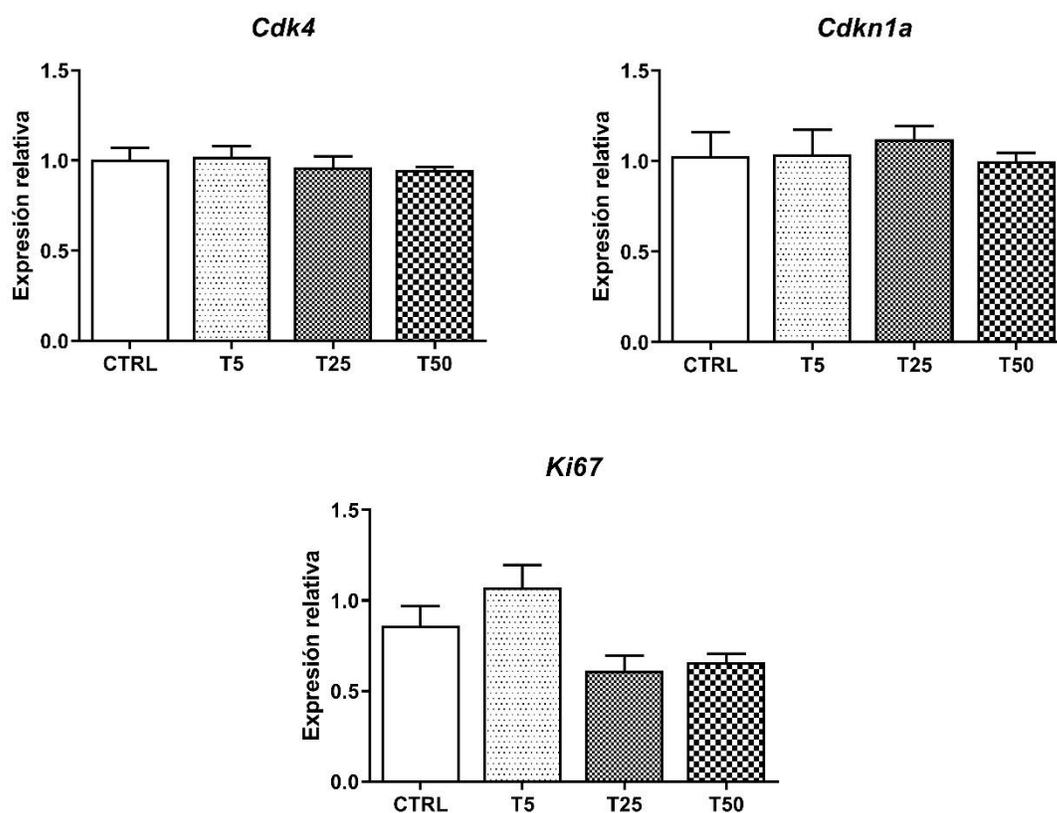


Figura 28. Efecto de las NP de TiO₂ sobre la expresión de enzimas del ciclo celular. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de las NP de TiO₂. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión de enzimas del ciclo celular. Se realizó la prueba ANOVA de una vía. T5 = TiO₂ 5 µg/mL, T25 = TiO₂ 25 µg/mL, T50 = TiO₂ 50 µg/mL.

3.4 Efecto de las NP de TiO₂ sobre la capacidad esteroidogénica del folículo antral

El crecimiento de los folículos antrales depende de la producción intra-folicular del E₂, el cual es el producto final del proceso de esteroidogénesis (Peretz y cols., 2013). Por esta razón, en este estudio evaluamos si la exposición a las NP de TiO₂ afectaban el proceso de esteroidogénesis en el folículo antral considerando la evaluación de los niveles hormonales y la expresión de genes involucrados en la síntesis de hormonas y de receptores de hormonas.

3.4.1 Efecto de las NP sobre los niveles de hormonas esteroideas

Los niveles de las hormonas esteroideas progesterona, androstenediona, testosterona y el E₂ se presentan en la figura 29. Los resultados mostraron que la exposición a las NP de TiO₂ indujo un incremento en los niveles de androstenediona y testosterona, pero no de progesterona. Interesantemente, este incremento en los niveles de hormonas precursoras no se tradujo en un incremento en los niveles de E₂ (figura 29).

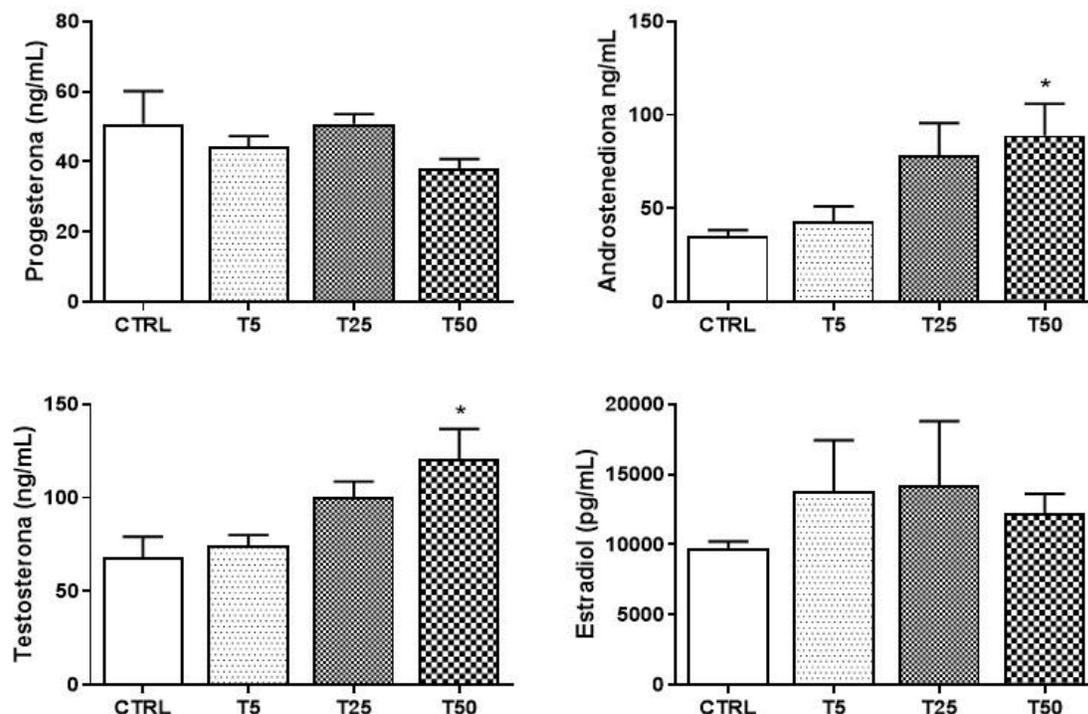


Figura 29. Efecto de la exposición a las NP deTiO₂ sobre los niveles de hormonas sexuales esteroideas. Después de 96 h de exposición a las NP, el medio de cultivo se colectó para cuantificar los niveles de las hormonas sexuales esteroideas mediante ELISA. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Dunnett (Androstenediona; $F_{(3,11)} = 4.14$; $p < 0.05$, testosterona; $F_{(3,11)} = 4.92$; $p < 0.05$). T5 = TiO₂ 5 μg/mL, T25 = TiO₂ 25 μg/mL, T50 = TiO₂ 50 μg/mL.

3.4.2 Efecto de las NP sobre la expresión de genes de la vía esteroidogénica

Para determinar si los cambios en la acumulación de hormonas en el medio de cultivo se debían a alteraciones en la expresión de los genes que participan en la vía de síntesis del E₂, decidimos evaluar la expresión de los genes implicados. La exposición a estas NP no modificó los niveles de mRNA de las enzimas *StAR*, *Cyp11a1*, *Hsd17b1*, ni del *Cyp19a1*. En cambio, la concentración más alta de NP de TiO₂ disminuyó los niveles de mRNA de la enzima *Hsd3b1* e incrementó los de la enzima *Cyp17a1* (figura 30).

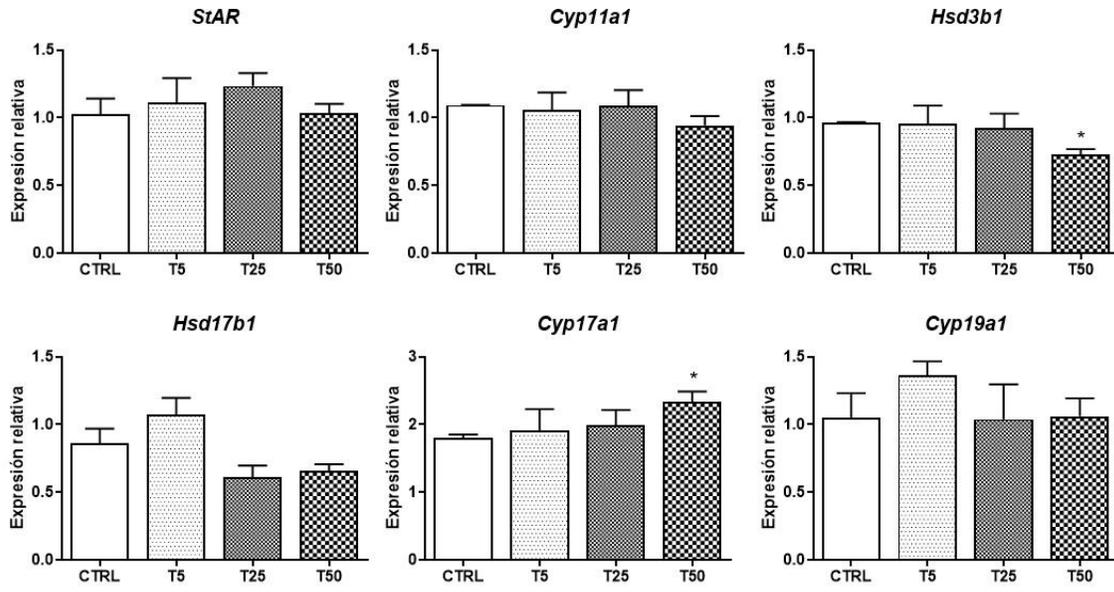


Figura 30. Efecto de la exposición a las NP de TiO₂ sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de estrógenos. Folicúlos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de NP de TiO₂. Al final del cultivo, los folicúlos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión de enzimas esteroidogénicas. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Dunnet. T5 = TiO₂ 5 $\mu\text{g/mL}$, T25 = TiO₂ 25 $\mu\text{g/mL}$, T50 = TiO₂ 50 $\mu\text{g/mL}$.

El citocromo Cyp1b1 participa en la degradación del E₂. Después de la síntesis del E₂, este puede ser convertido a 4-hidroxiestradiol por el citocromo Cyp1b1 y posteriormente ser convertido a 4-metoxiestradiol por la actividad catecol-O-metiltransferasas (Go y cols., 2015), por lo que las alteraciones en su expresión podrían manifestarse como alteraciones en los niveles de mRNA. Así, para determinar si la exposición a las NP de TiO₂ contribuía con la degradación del E₂, evaluamos los niveles de mRNA de *Cyp1b1* en los folicúlos antrales al final del cultivo. Después de la exposición a las NP de TiO₂ se observó una disminución en la expresión génica solo con la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ (figura 31).

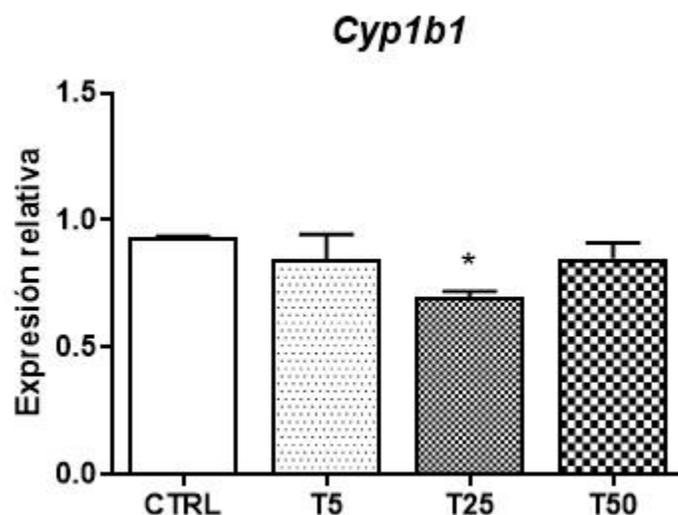


Figura 31. Efecto de las NP de TiO₂ sobre la expresión de *Cyp1b1*. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de NP de TiO₂. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión génica de *Cyp1b1*. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *pos hoc* Dunnet ($F_{(3,12)} = 3.68$; $p < 0.05$). T5 = TiO₂ 5 $\mu\text{g/mL}$, T25 = TiO₂ 25 $\mu\text{g/mL}$, T50 = TiO₂ 50 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.3 Efecto de las NP sobre la expresión de receptores de hormonas esteroideas gonadotropinas

El proceso de esteroidogénesis folicular está regulado por la unión de las hormonas gonadotropinas con sus receptores y de las hormonas esteroideas con sus receptores (Hernández-Ochoa y *cols.*, 2018). Teniendo en cuenta que la exposición a NP podría afectar a algunos receptores, se decidió evaluar la expresión génica del receptor de FSH (*FSHR*), del receptor a LH (*Lhcgr*), del receptor de andrógenos (*AR*, por sus siglas en inglés: **androgen receptor**) y del receptor a estrógenos α (*ER1*, por sus siglas en inglés: **estrogen receptor 1**) (figura 32). Aunque se observó una disminución respecto al control en los niveles de mRNA del *FSHR* en las dos concentraciones más altas, no fue significativa. Por otro lado, la concentración intermedia de NP de TiO₂ (25 $\mu\text{g/mL}$) disminuyó la expresión del *AR* y del

ER1. La concentración más alta disminuyó la expresión del *Lhcgr* y del *ER1* (figura 32). Estos hallazgos sugieren una alteración en la expresión de receptores importantes para el proceso de síntesis de estrógenos.

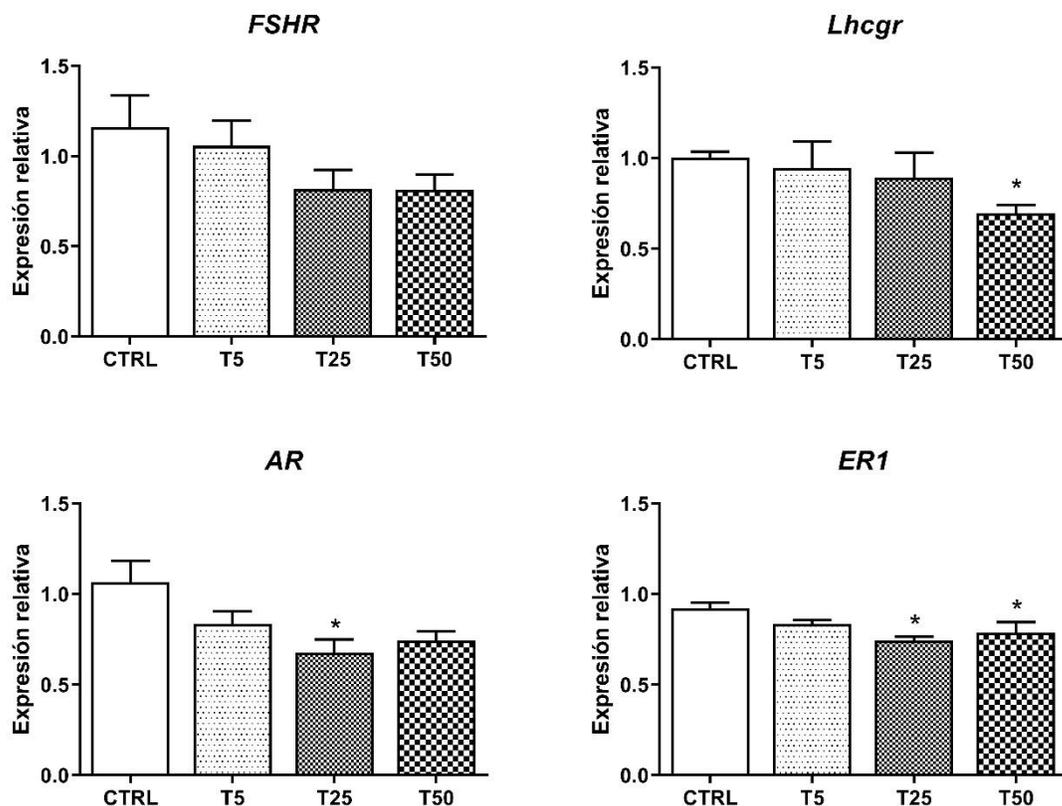


Figura 32. Efecto de las NP de TiO₂ sobre la expresión de receptores celulares. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de NP de TiO₂. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión de receptores celulares. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *pos hoc* Dunnet (AR; $F_{(3,12)} = 4.60$; $p < 0.05$, ER1; $F_{(3,12)} = 4.68$; $p < 0.05$). T5 = TiO₂ 5 $\mu\text{g/mL}$, T25 = TiO₂ 25 $\mu\text{g/mL}$, T50 = TiO₂ 50 $\mu\text{g/mL}$.

3.5 Efecto de las NP de TiO₂ sobre el estrés oxidante

Para confirmar la participación del estrés oxidante en los efectos de las NP sobre los folículos antrales, se evaluó la expresión génica de enzimas antioxidantes, así como los niveles de ROS/RNS. La expresión de la enzima *SOD1* disminuyó por la exposición a las dos concentraciones más altas (25 y 50 µg/mL), mientras que la expresión de la enzima *GPX* sólo disminuyó con la concentración intermedia (25 µg/mL) (figura 33). La expresión del resto de las proteínas evaluadas no se alteró con ninguna concentración empleada (figura 33).

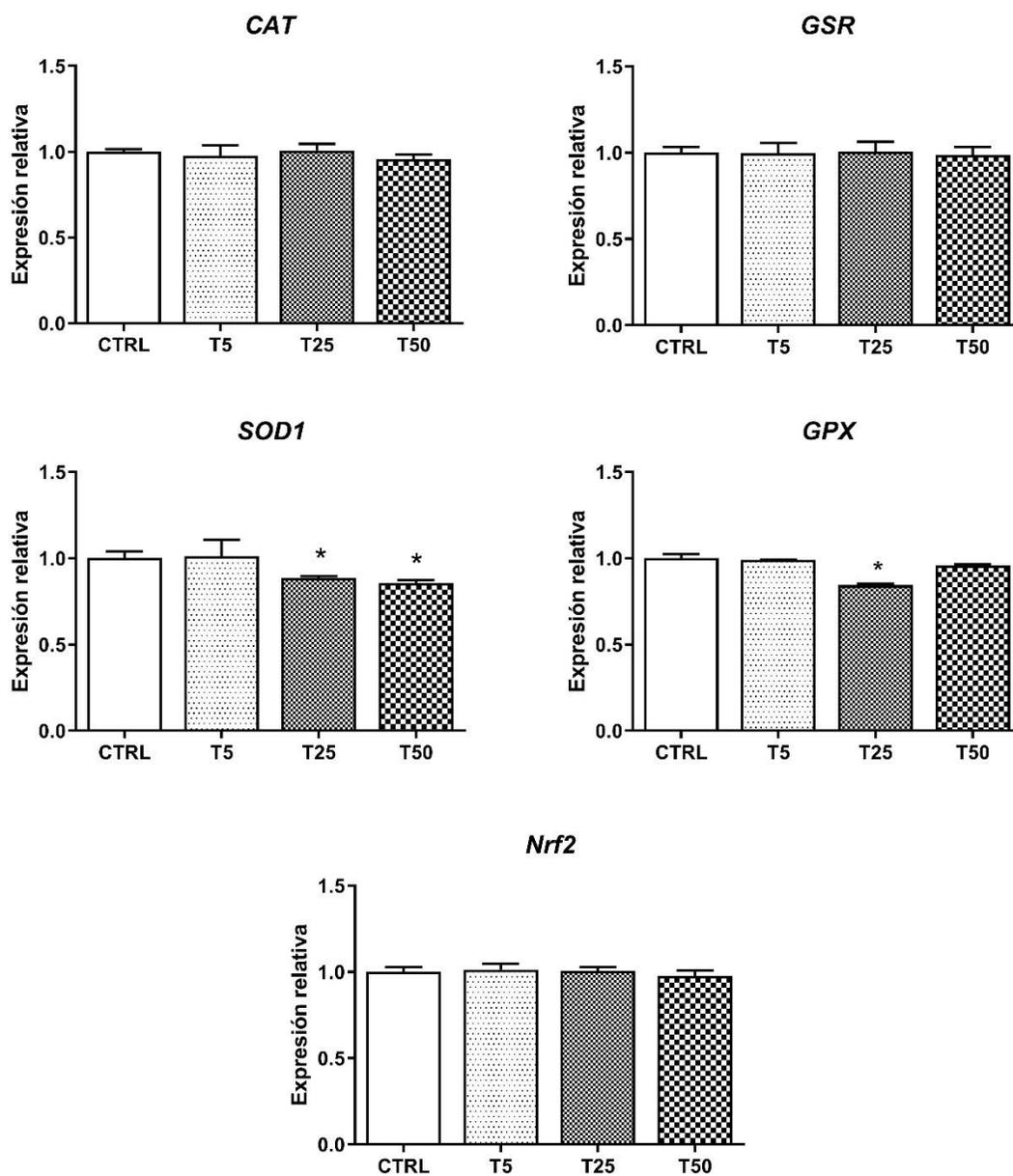


Figura 33. Efecto de las NP de TiO₂ sobre la expresión de enzimas antioxidantes. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de las NP de TiO₂. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión de enzimas antioxidantes. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *pos hoc* Dunnet (GPX; $F_{(3,12)} = 21.41$; $p < 0.01$). T5 = TiO₂ 5 µg/mL, T25 = TiO₂ 25 µg/mL, T50 = TiO₂ 50 µg/mL.

A continuación, se presentan los resultados de la evaluación de la generación de ROS/RNS a diferentes tiempos. Para este análisis se empleó la concentración intermedia en la cual

observamos mayores alteraciones en la expresión de las enzimas antioxidantes. Las evaluaciones a las 48, 72 y 96 h no mostraron inducción o incremento en los niveles de ROS/RNS después de la exposición a NP de TiO₂ (figura 34).

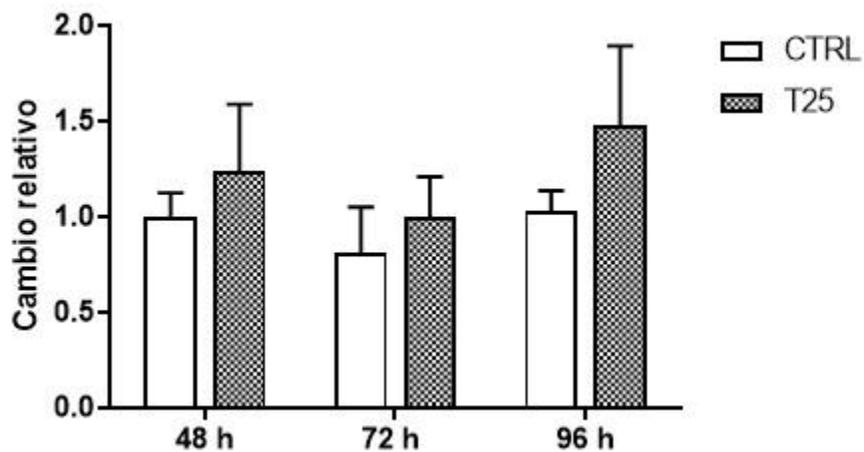


Figura 34. Efecto de las NP de TiO₂ en los niveles de ROS/RNS en el folículo antral a través del tiempo. Los niveles de ROS/RNS fueron cuantificados en folículos antrales expuestos a TiO₂ (25 µg/mL). Los niveles de ROS/RNS se cuantificaron a las 48, 72 y 96 h normalizando por concentración de proteína en cada muestra y se reportó como cambio relativo respecto al control. No se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control en el mismo tiempo de acuerdo con la prueba t de Student. T25= TiO₂ 25 µg/mL.

3.6 Efecto de las NP de ZnO sobre reguladores de apoptosis y del ciclo celular

En esta parte del estudio se incluyó una nueva concentración de NP de ZnO (10 µg/mL) puesto que la concentración de 25 µg/mL se descartó con base en los resultados de actividad metabólica. A pesar de que no observamos una alteración en la actividad metabólica de los folículos dentro del rango de concentraciones que se emplearon en este trabajo, las alteraciones morfológicas y ultraestructurales observadas en el folículo antral sugerían la posibilidad de que estuviera iniciándose un proceso de apoptosis celular cuyo efecto aún no se reflejara mediante el MTT. Dado que la inducción de apoptosis puede estar relacionada con la disminución del diámetro en los folículos antrales (Peretz y cols., 2013), evaluamos la expresión génica de proteínas involucradas en este proceso. Ninguna concentración afectó los niveles de *Bax*, *Bcl2* ni de la *cas3* (figura 35). Estos resultados sugieren que las NP de ZnO no inducen apoptosis en los folículos a ninguna de las concentraciones evaluadas.

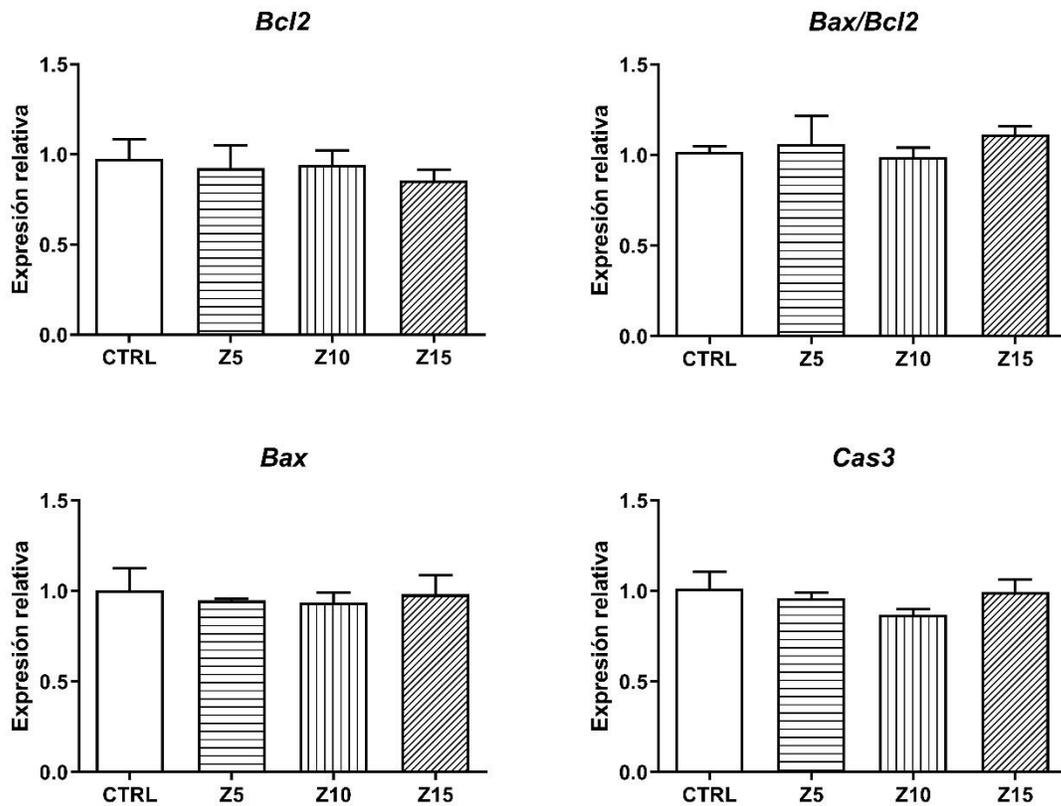


Figura 35. Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de enzimas apoptóticas. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de NP de ZnO. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión génica de proteínas de la apoptosis. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Dunnet. Z5 = ZnO 5 $\mu\text{g/mL}$, Z10 = ZnO 10 $\mu\text{g/mL}$, Z15 = ZnO 15 $\mu\text{g/mL}$.

Dado que no observamos efecto en los marcadores de apoptosis, otra posibilidad que podría relacionarse con las alteraciones observadas en el diámetro y morfología del folículo antral es la alteración en reguladores del ciclo celular. Para determinar el efecto de las NP de ZnO sobre el ciclo celular, evaluamos la expresión de enzimas importantes en este proceso (figura 36). Ninguna de las enzimas evaluadas afectó la expresión de estas enzimas, sugiriendo que estos materiales no afectan el ciclo celular en las concentraciones y tiempos evaluados.

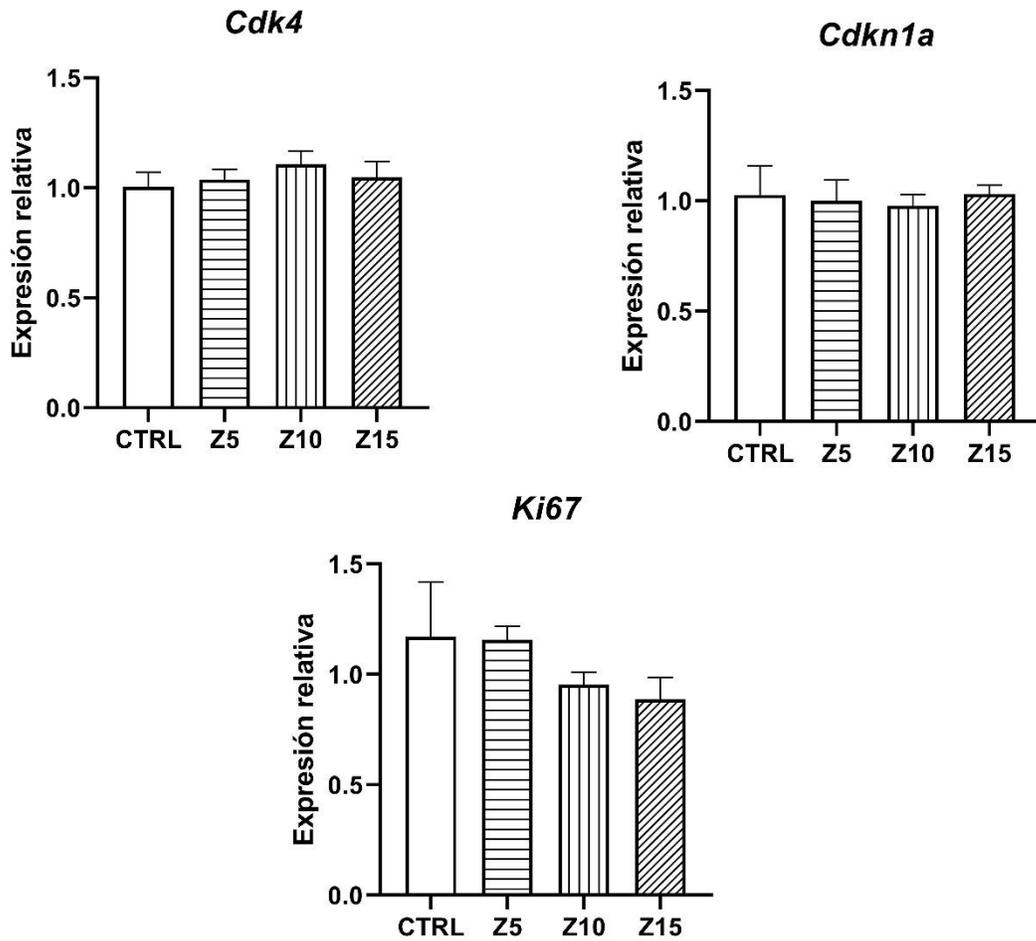


Figura36. Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular y de Ki67. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de NP de ZnO. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión de enzimas del ciclo celular. Z5 = ZnO 5 µg/mL, Z10 = ZnO 10 µg/mL, Z15 = ZnO 15 µg/mL. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía.

3.7 Efecto de las NP de ZnO sobre la capacidad esteroideogénica del folículo antral

A continuación, se muestran los resultados de la evaluación del efecto de las NP de ZnO sobre la capacidad de los folículos antrales para sintetizar estradiol a partir de colesterol.

3.7.1 Efecto de las NP sobre los niveles de hormonas esteroideas

Para determinar los efectos de la exposición a las NP de ZnO sobre la síntesis de estrógenos, se cuantificaron los niveles de E₂, así como algunos precursores en el medio de cultivo (figura 37). La síntesis de progesterona, androstenediona y testosterona no fue afectada por ninguna de las concentraciones evaluadas. Interesantemente, los niveles de E₂ incrementaron sólo con la concentración más baja de NP de ZnO (5 µg/mL), mientras que las concentraciones más altas no tuvieron efecto sobre los niveles de E₂ y de sus precursores (figura 37).

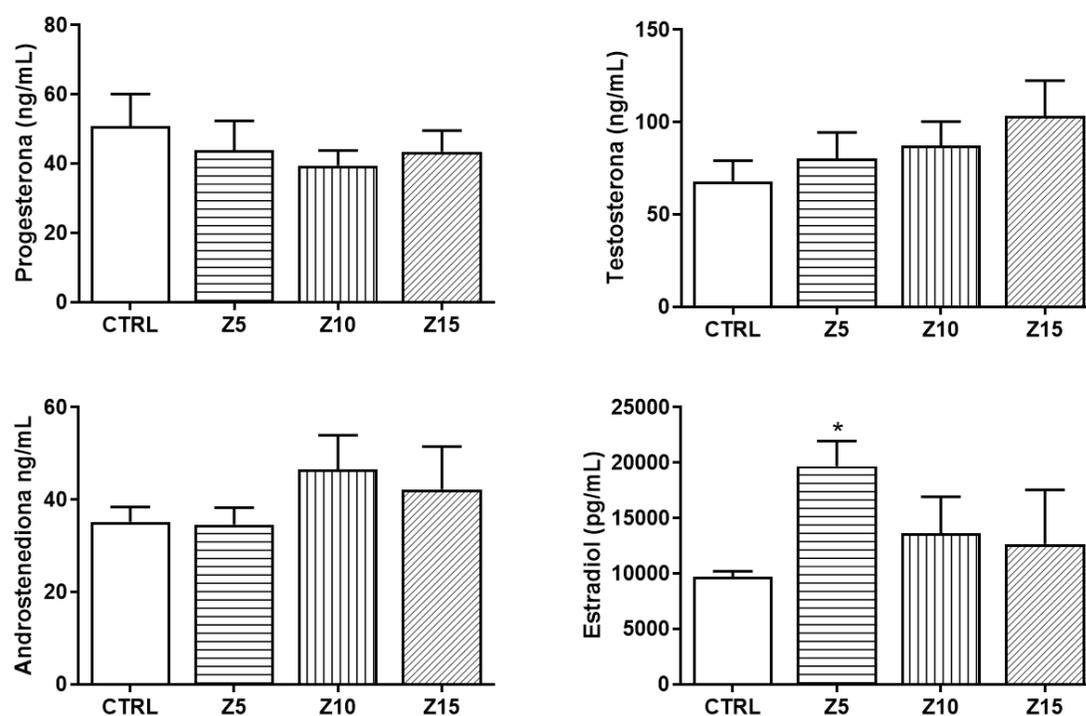


Figura 37. Efecto de las NP de ZnO sobre los niveles de hormonas sexuales esteroideas. Después de 96 h de exposición a NP, el medio de cultivo se colectó para cuantificar hormonas sexuales esteroideas mediante ELISAs. * indica diferencia significativa respecto al control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Dunnet ($F_{(3,15)} = 4.06$; $p < 0.05$). Z5 = ZnO 5 µg/mL, Z10 = ZnO 10 µg/mL, Z15 = ZnO 15 µg/mL.

3.7.2 Efecto de las NP sobre la expresión de genes de la vía esteroidogénica

Se evaluó la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de estrógenos para determinar si la exposición a las NP de ZnO afectaba la expresión de estas enzimas. La expresión de los genes *StAR*, *Cyp11a1*, *Hsd17b1* y *Cyp17a1* no fue afectada por ninguna de las concentraciones empleadas (figura 38). La concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de NP de ZnO disminuyó la expresión del gen *Hsd3b1*, mientras que la expresión de *Cyp19a1* incrementó sus niveles con la concentración más baja de NP de ZnO (figura 38).

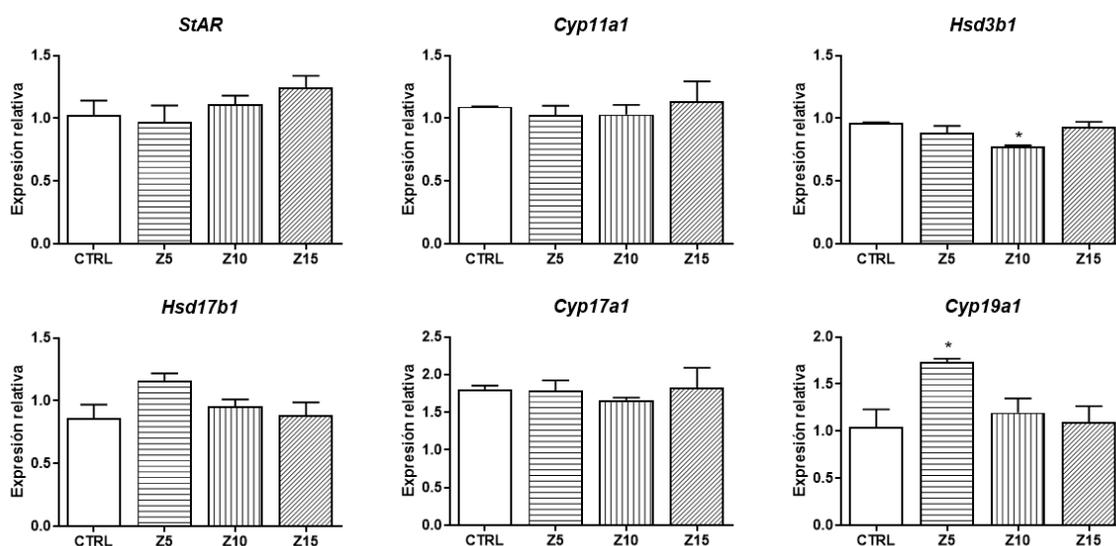


Figura 38. Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de estrógenos. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de NP de ZnO. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión de enzimas esteroidogénicas. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Dunnett (*Hsd3b1*; $F_{(3,12)} = 3.55$; $p < 0.05$, *Cyp19a1*; $F_{(3,12)} = 4.61$; $p < 0.05$). Z5 = ZnO 5 $\mu\text{g/mL}$, Z10 = ZnO 10 $\mu\text{g/mL}$, Z15 = ZnO 15 $\mu\text{g/mL}$.

La testosterona es el sustrato del *Cyp19a1* para producir E_2 . En este trabajo se observó un incremento en la expresión del *Cyp19a1*, que podría explicar el incremento en los niveles de E_2 en la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. Esos resultados sugerían que los niveles de la hormona

precursora del E₂, la testosterona, podrían estar disminuidos. Sin embargo, los niveles de testosterona fueron similares en el medio de cultivo de los folículos tratados con las NP de ZnO y en los folículos control (figura 39). Por lo tanto, el incremento en los niveles de E₂ podría relacionarse con una disminución en su degradación. Se evaluaron los niveles de mRNA del *Cyp11b1*, que degrada el E₂. La expresión del *Cyp11b1* disminuyó significativamente en los folículos tratados con 5 µg/mL de NP de ZnO comparado con los folículos control (figura 39).

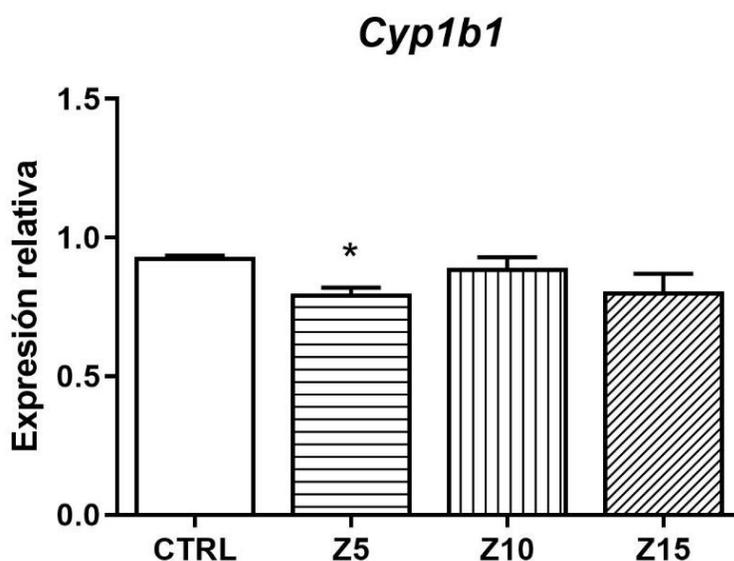


Figura 39. Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión del *Cyp11b1*. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de las NP de ZnO. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión génica del *Cyp11b1*. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *pos hoc* Dunnet (Bc12; $F_{(3,12)} = 3.13$; $p < 0.05$). Z5 = ZnO 5 µg/mL, Z10 = ZnO 10 µg/mL, Z15 = ZnO 15 µg/mL.

3.7.3 Efecto de las NP sobre la expresión de receptores de hormonas esteroideas gonadotropinas

La inducción de la expresión de genes de receptores celulares es importante en el proceso de esteroidogénesis ya que pueden ser inducidos por diferentes hormonas para promover la síntesis de estrógenos (LaVoie, 2017). Para determinar si existía un efecto de la exposición a estas NP sobre los receptores celulares que intervienen en la síntesis de estrógenos, se evaluó la expresión génica de los más importantes. La exposición a las NP de ZnO solamente disminuyó de forma significativa la expresión del *ER1* con la concentración más baja (5 $\mu\text{g/mL}$) y no modificó la expresión de *FSHR*, *Lhcgr* y *AR* comparado con el control (figura 40).

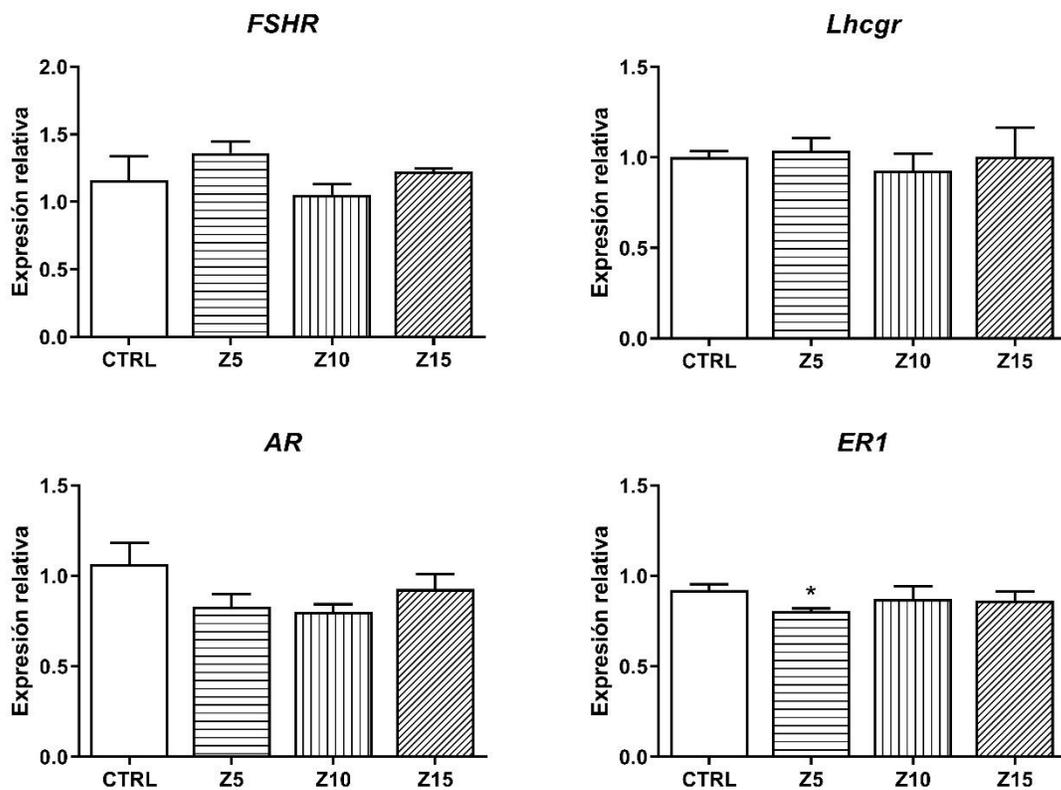


Figura 40. Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de receptores celulares. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de las NP de ZnO. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión de receptores celulares. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *pos hoc* Dunnet. Z5 = ZnO 5 $\mu\text{g/mL}$, Z10 = ZnO 10 $\mu\text{g/mL}$, Z15 = ZnO 15 $\mu\text{g/mL}$.

3.8 Efecto de las NP de ZnO sobre el estrés oxidante

Para determinar si la exposición a las NP de ZnO inducía estrés oxidante, se evaluó la expresión de algunas enzimas antioxidantes. Los resultados mostraron que solamente la concentración más alta de NP de ZnO (15 $\mu\text{g/mL}$) aumentó significativamente la expresión de los genes *Nrf2*, *SOD1*, *CAT* y *GSR*, y disminuyó significativamente la expresión de la *GPX* comparado con el control (figura 41).

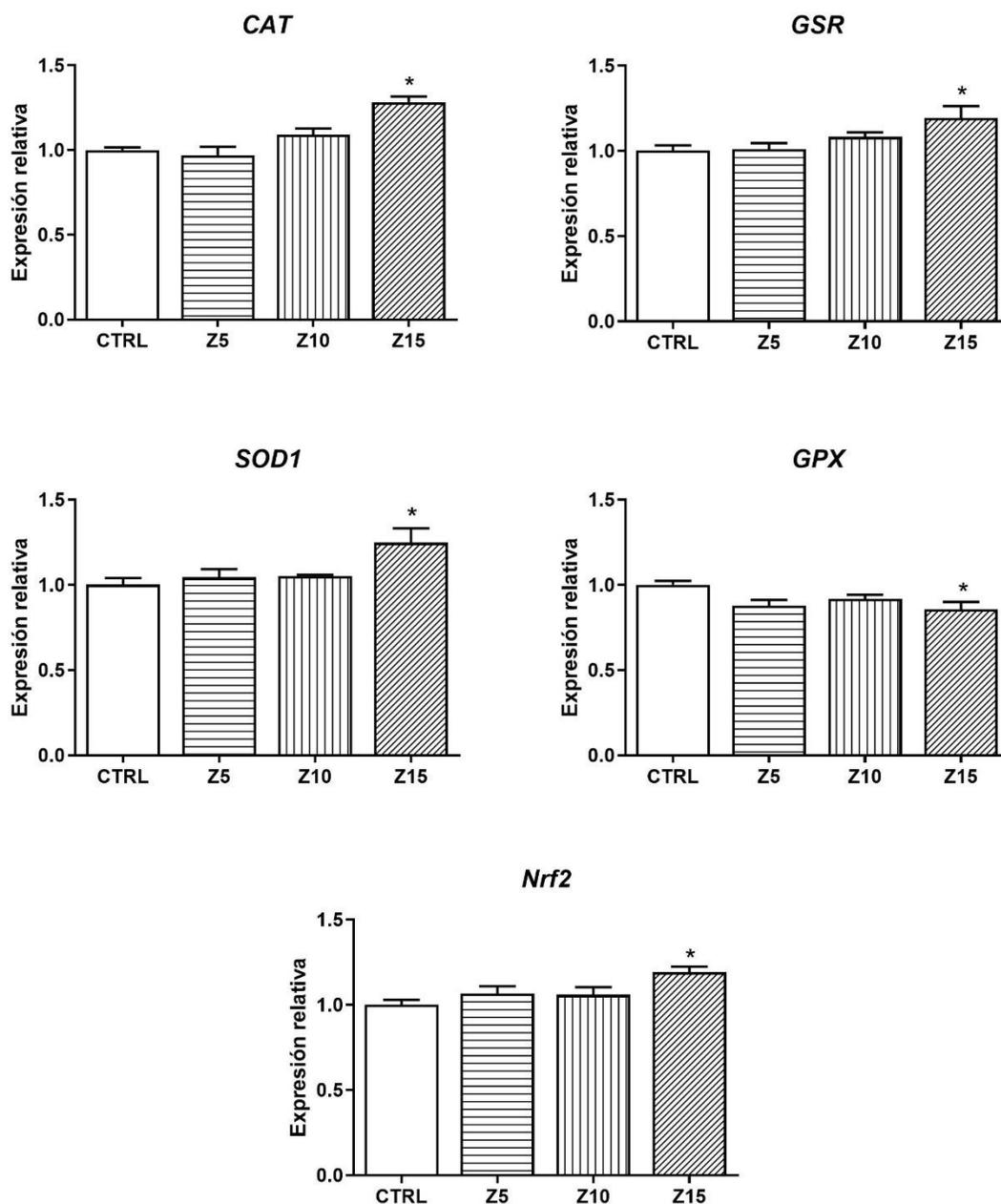


Figura 41. Efecto de las NP de ZnO sobre la expresión de enzimas antioxidantes. Folículos antrales fueron expuestos a diferentes concentraciones de NP de ZnO. Al final del cultivo, los folículos se colectaron y procesaron para qPCR. Se evaluó la expresión de enzimas antioxidantes. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía y la prueba *pos hoc* Dunnet (CAT; $F_{(3,12)} = 14.98$; $p < 0.001$, SOD1; $F_{(3,12)} = 4.02$; $p < 0.05$, GSR; $F_{(3,12)} = 4.12$; $p < 0.05$, NRF2; $F_{(3,12)} = 3.72$; $p < 0.05$, GPX; $F_{(3,12)} = 4.26$; $p < 0.05$). Z5 = ZnO 5 $\mu\text{g/mL}$, Z10 = ZnO 10 $\mu\text{g/mL}$, Z15 = ZnO 15 $\mu\text{g/mL}$.

Para confirmar la inducción de estrés oxidante por la exposición a las NP de ZnO se evaluaron los niveles de ROS/RNS en los folículos antrales expuestos a la concentración más alta durante 48, 72 y 96 h. Aunque en las primeras horas de cultivo (48 y 72 h) no se observaron cambios, a las 96 h se observó una disminución significativa en los niveles relativos de ROS/RNS (figura 42) comparado con el control.

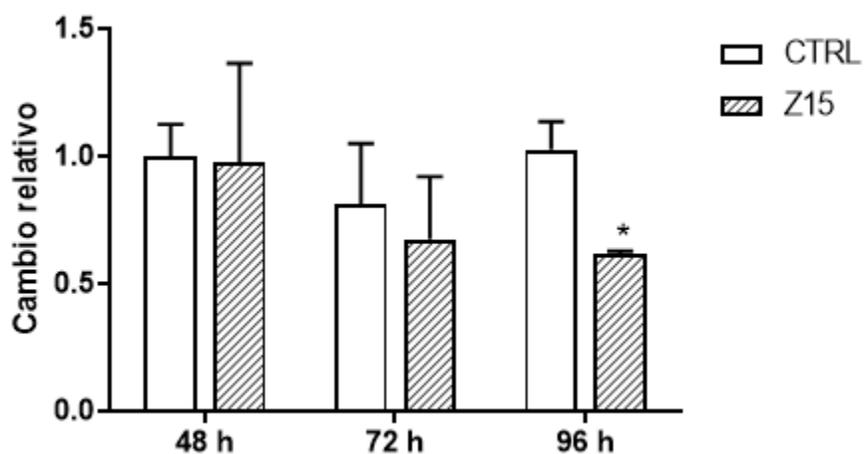


Figura 42. Efecto de las NP de ZnO en los niveles de ROS/RNS en el folículo antral a través del tiempo. Los niveles de ROS/RNS fueron cuantificados en folículos antrales expuestos a ZnO (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los niveles de ROS/RNS se cuantificaron a las 48, 72 y 96 h y los valores se normalizaron por concentración de proteína en cada muestra. Los valores reportados se indican como cambio relativo respecto al control. Z15= ZnO 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el control de acuerdo con la prueba t de Student.

4 Discusión

4.1 Resumen de efectos

Este trabajo se enfocó en evaluar los efectos a nivel reproductivo de dos NP de amplio uso en la industria cosmética y de los alimentos. En particular, enfocamos el estudio al análisis de los efectos sobre la función del folículo antral. Para una mejor comprensión de la interacción NP-folículo antral, efectos tóxicos y mecanismos de toxicidad, el estudio se dividió en la caracterización fisicoquímica de las NP, evaluación de la interacción NP-folículo antral y en el efecto de las NP sobre parámetros morfológicos y de la función folicular, así como inducción de estrés oxidante.

Se observó un comportamiento y efectos diferentes para cada una de las NP evaluadas. Las NP de TiO_2 tendieron a aglomerarse tanto dentro como fuera de las células foliculares, mientras que aparentemente las NP de ZnO se disolvieron en el medio de cultivo. Por otro lado, la exposición a NP de TiO_2 indujo un incremento en el diámetro folicular y alteración en el arreglo del citoesqueleto, mientras que la exposición a las NP de ZnO tuvo un efecto opuesto, disminuyendo el diámetro folicular, y afectando tanto la morfología folicular como el arreglo del citoesqueleto. La co-exposición de las NP con el antioxidante Tx pareció proteger de manera parcial los efectos inducidos por las NP de TiO_2 , pero no aquellos inducidos por la exposición a NP de ZnO .

Al realizar la evaluación de los efectos de las NP de TiO_2 sobre la función esteroideogénica del folículo antral encontramos resultados diferentes que podrían deberse al estado de agregación/aglomeración de las NP en las distintas concentraciones empleadas y al potencial como disruptor endocrino que se ha descrito recientemente. Por un lado, la concentración de

25 µg/mL de NP de TiO₂ disminuyó la expresión de varios genes implicados en la síntesis de estrógenos y en la respuesta antioxidante, probablemente como resultado de la inducción de apoptosis observada mediante la disminución de la expresión de *Bcl2* y el incremento de la razón Bax/Bcl2. La concentración más alta de estas NP incrementó los niveles de las hormonas androstenediona y testosterona, lo que pudo resultar en una retroalimentación negativa, disminuyendo la expresión del *Lhcgr* y el *ER1*.

La concentración más baja de NP de ZnO (5 µg/mL) favoreció la acumulación de E₂ probablemente por el incremento en *Cyp19a1* y la disminución de *Cyp11b1* cuya expresión podría estar regulada por factores dependientes de zinc. Por otro lado, la concentración más alta de estas NP indujo una respuesta antioxidante, evidenciado por el incremento en la expresión de la mayoría de las enzimas antioxidantes evaluadas, así como una disminución en los niveles de ROS tras 96 h de exposición.

4.2 Citotoxicidad de las NP sobre el folículo antral

Aunque existen diversos grupos de investigación trabajando en el estudio del folículo antral, de su desarrollo y la toxicidad de xenobióticos (Hernández-Ochoa y cols., 2013; Patel y cols., 2016; Peretz y cols., 2013), pocos estudios han empleado un método inicial que evalúe la citotoxicidad acompañando la evaluación del diámetro folicular debido a limitaciones del modelo. Recientemente un estudio evaluó el efecto de una variedad de ftalatos sobre el folículo antral. En ese estudio emplearon la cuantificación del ATP en conjunto con la evaluación del diámetro folicular, como un parámetro indirecto de la viabilidad celular (Rasmussen y cols., 2017). Aunque estos parámetros (diámetro folicular y actividad metabólica) tienen la limitante de no evaluar directamente la citotoxicidad, es decir, la

viabilidad celular, en nuestro trabajo consideramos en conjunto el diámetro y la actividad metabólica (ensayo de MTT), como un indicador de la citotoxicidad de las NP. Esta consideración fue con base en estudios previos que han demostrado que el diámetro folicular depende de la proliferación celular (Rao y cols., 1978), y que el ensayo de MTT evalúa la actividad metabólica celular (Kumar y cols., 2018).

Aunque ninguna concentración empleada de NP de TiO₂ disminuyó la actividad metabólica de los folículos antrales durante el tiempo de evaluación, se observó un incremento en el diámetro folicular a partir de las 48 h de exposición (25 µg/mL) y de las 72 h (50 µg/mL) para estas NP, así como disminución del gen antiapoptótico *Bcl2* en la concentración de 25 µg/mL que sugiere inducción de apoptosis a las 96 h. Estos resultados podrían entenderse como contradictorios, sin embargo, puede tener una explicación basada en la temporalidad de las evaluaciones y en la etapa del proceso de apoptosis analizada. Los reguladores de apoptosis son mantenidos bajo estricto control por la maquinaria celular. El *Bcl2* es un protooncogén cuya sobre expresión conduce a la inhibición de la muerte celular por apoptosis dado que impide la liberación de citocromo C de la mitocondria al citosol y la posterior activación de caspasas efectoras del proceso (Beck y cols., 2002). Por lo tanto, la disminución en su expresión se ha asociado con liberación de citocromo c y posterior inducción de apoptosis. Las caspasas son proteasas que luego de ser activadas escinden una variedad de proteínas que conducen a la apoptosis (Matsuura y cols., 2016), es decir, en el proceso de apoptosis la regulación en la expresión de genes como *Bcl2* es uno de los primeros pasos, mientras que la degradación de proteínas y por lo tanto la disminución en su actividad es uno de los últimos pasos. Por otro lado, el MTT es comúnmente empleado como una técnica de citotoxicidad ya que mide la actividad metabólica en términos de la actividad enzimática de

deshidrogenasas (Kumar y cols., 2018), y por la relativa simplicidad de la técnica no permite distinguir entre mecanismos más específicos de daño. Lo anterior sugiere que a las 96 h está iniciando el proceso de apoptosis y que por ello no observamos aun un efecto mediante la técnica de MTT en la exposición a NP de TiO₂ (25 µg/mL).

En las evaluaciones de las NP de ZnO, los resultados muestran que ninguna concentración afectó la expresión de genes reguladores de apoptosis. Sin embargo, tanto la actividad metabólica como el diámetro folicular disminuyeron en tiempos cortos (24 y 48 h), y después, a las 72 y 96 h de exposición se observó una recuperación en la concentración alta de estas NP (15 µg/mL). Aunque hasta ahora no hay estudios que hayan descrito una recuperación al insulto inducido por algún xenobiótico en los folículos antrales, si se ha descrito el proceso de adaptación a xenobióticos en otros tipos celulares como el proceso mediante el cual las células se pueden adaptar a la exposición a xenobióticos, regulando la biosíntesis de proteínas involucradas en el metabolismo a través de la activación de xenosensores que modulan la expresión de genes (Klotz y Steinbrenner, 2017). Lo anterior sugiere un proceso de adaptación de los folículos a las NP de ZnO en la concentración alta, permitiendo la recuperación del efecto sobre el diámetro folicular y en su actividad metabólica.

4.3 Interacción NP-folículo antral

Con base en las observaciones de la ultraestructura folicular que muestran alteraciones en la membrana basal, así como una alteración en la estructura y arreglo celular, y en los resultados de expresión de genes del ciclo celular y de apoptosis, es posible que el incremento en el diámetro folicular sea resultado del daño a la arquitectura folicular. Esta idea se apoya en los hallazgos de estudios que han observado que la exposición a NP afecta membranas y barreras

en los sistemas biológicos. En un estudio *in vitro* que empleó un sistema de barrera hematoencefálica se encontró que la exposición a NP de plata incrementa la permeabilidad de la barrera y disminuyó los niveles de la proteína de uniones estrechas ZO-1 (Dan y cols., 2015). En otro estudio con un modelo *in vivo* se observó una alteración en la barrera hematoencefálica después de la exposición a NP de plata, de cobre y de aluminio (Sharma y cols., 2010). Además, en un modelo *in vivo* se observó que las NP de TiO₂ son capaces de afectar la función de la barrera hemato-láctica, barrera fisiológica que provee importante protección a la integridad de la leche materna y a la salud de las crías (Zhang y cols., 2015).

Dado que las NP empleadas en este estudio se usan comúnmente como aditivos alimentarios y en productos de uso personal, entre otros (Kim y cols., 2016), la exposición a estos materiales por diferentes rutas, como la inhalatoria, dérmica y oral, es de esperarse. Se ha descrito la acumulación de estos materiales en el ovario después de una exposición intragástrica (Tassinari y cols., 2014; Zhao y cols., 2013). Otros estudios empleando modelos de exposición *in vivo* han encontrado distribución a otros órganos como riñones, hígado, cerebro y placenta (An y cols., 2014; Murugadoss y cols., 2020). Por lo tanto, el ingreso de las NP por diferentes rutas, la distribución y deposición de las mismas en el ovario es una ruta potencial de daño en la estructura, organización y función del folículo antral.

Las vías de internalización que involucran la endocitosis mediada por clatrina y caveolinas, así como la macropinocitosis, han sido ampliamente descritas en diferentes tipos celulares después de la exposición a NP, que incluyen las de TiO₂ y las de ZnO (Jaeger y cols., 2012; Thurn y cols., 2011). Nuestros resultados concuerdan con lo anterior ya que en nuestro modelo de estudio se observó, mediante un análisis de TEM, la internalización de las NP de TiO₂ en las células del folículo antral principalmente por vías no fagocíticas después de 96 h

de exposición. También se observaron invaginaciones de la membrana celular en forma de vesículas que contenían a las NP, así como estructuras de macropinosomas. Por otro lado, el análisis de la internalización de las NP de ZnO mediante TEM, después de 96 h de exposición no mostró la presencia intra o extracelular de las NP, sugiriendo su disolución en nuestro sistema de cultivo *in vitro*. Este hallazgo se confirmó por la ausencia de NP en el medio de cultivo analizado mediante TEM, así como por el débil o tenue perfil de la corona de proteínas encontrado después de incubar el medio de cultivo con NP de ZnO. Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de estudios previos que emplearon estas NP de ZnO y encontraron que son capaces de disolverse en dos medios de cultivo diferentes (DMEM y BEGM) (George *y cols.*, 2010). Sin embargo, en ese estudio también se observó que las NP de ZnO pueden ingresar como NP a las células durante las primeras horas de exposición, y ahí disolverse dentro de compartimentos como los lisosomas. Dado que en el presente estudio se evaluó la internalización y localización de las NP al final de la exposición (96 h), es probable que las NP de ZnO estén ingresando a las células del folículo antral en tiempos cortos y después se disuelvan dentro de compartimentos celulares, incrementando la complejidad del sistema y de los efectos, dada la potencial interacción del folículo antral con las NP y con los iones de zinc.

El análisis de localización de las NP en el folículo antral mostró que las NP de TiO₂ se localizan en las distintas estirpes celulares, mayoritariamente en las células de la teca, seguidas de las células de la granulosa y escasamente en las células de la cumula (éstas en comunicación directa con el ovocito). Interesantemente, también se observaron NP de TiO₂ en el espacio intercelular, sugiriendo que pueden ingresar por vías para-celulares, como se sugiere en el estudio de Li *y cols.* (2015), en el cual se observó un incremento en la

permeabilidad paracelular en células de endotelio expuestas a NP de oro. En el presente trabajo las NP se encontraban formando aglomerados tanto en el espacio intra como extracelular. Se ha descrito que la aglomeración de estos nanomateriales en las células puede afectar su eliminación y propiciar su acumulación (Bruinink *y cols.*, 2015), y que la disolución de los nanomateriales afecta tanto la internalización como los efectos tóxicos que puedan causar (Misra *y cols.*, 2012). Lo anterior, sugiere que las diferencias observadas en los efectos inducidos por la exposición a estas NP se deben, al menos en parte, al comportamiento tan diferente de estos materiales en nuestro sistema.

La exposición a ambas NP afectó al ovocito dentro del folículo antral a pesar de no llegar a él directamente. El análisis de TEM mostró alteración de las proyecciones citoplasmáticas en los ovocitos de los folículos antrales expuestos a las NP de TiO₂ y ZnO. Las proyecciones citoplasmáticas son extensiones citoplásmicas entre los ovocitos y las células de la cúmula que permiten la comunicación entre estos tipos celulares mediante uniones tipo gap (Baena y Terasaki, 2019; Clarke, 2018). Es bien sabido que la comunicación mediada por uniones gap entre el ovocito y las células de la cúmula es importante para el flujo de nutrientes hacia el ovocito, así como para regular el inicio de la meiosis (Russell *y cols.*, 2016). La alteración en la comunicación mediada por uniones tipo gap por exposición a xenobióticos puede resultar en anomalías en la maduración del ovocito (Acuña-Hernández *y cols.*, 2018). En estudios previos se ha reportado que las proyecciones citoplasmáticas se forman mediante la participación de tubulina y actina, que se proyectan desde las células de la cúmula al ovocito (El-Hayek *y cols.*, 2018). Dado que en este trabajo se encontró que la exposición a estos materiales tiene efectos adversos en la organización del citoesqueleto, es posible que ambas NP estén indirectamente afectando la formación de las proyecciones citoplasmáticas debido

a la alteración en el arreglo del citoesqueleto de las células de la cúmula y del ovocito a pesar de no llegar directamente a la célula germinal. Por lo tanto, la pérdida o alteración en las proyecciones citoplasmáticas potencialmente resultará en la pérdida o alteración de la comunicación entre el ovocito y las células de la cúmula, en consecuencia, afectando la calidad del ovocito. Lo anterior se apoya en estudios que han mostrado alteración en la comunicación mediada por uniones tipo gap debido a la exposición a NP. Por ejemplo, se ha observado disminución en la comunicación mediada por uniones tipo gap en cardiomiocitos después de la exposición a NP de sílica (Du y cols., 2017). También se observó que la exposición a NP de fulereno disminuye la expresión de proteínas de unión tipo gap e interrumpió la comunicación tipo gap debido a la retracción de las proyecciones citoplasmáticas, acelerando la reanudación de la meiosis en el ovocito en un modelo de cultivo de COC (Lei y cols., 2018).

Hasta aquí, nuestros resultados muestran que las dos NP metálicas de uso común en cosméticos y alimentos causan efectos diferentes sobre la organización, morfología y ultraestructura del folículo antral. Además, observamos que estos efectos son influenciados de manera importante por las características fisicoquímicas y por el comportamiento de los materiales en el medio de cultivo. Observamos el papel importante que tiene la capacidad de formar aglomerados de las NP de TiO_2 y de disolverse de las NP de ZnO (figura 43).

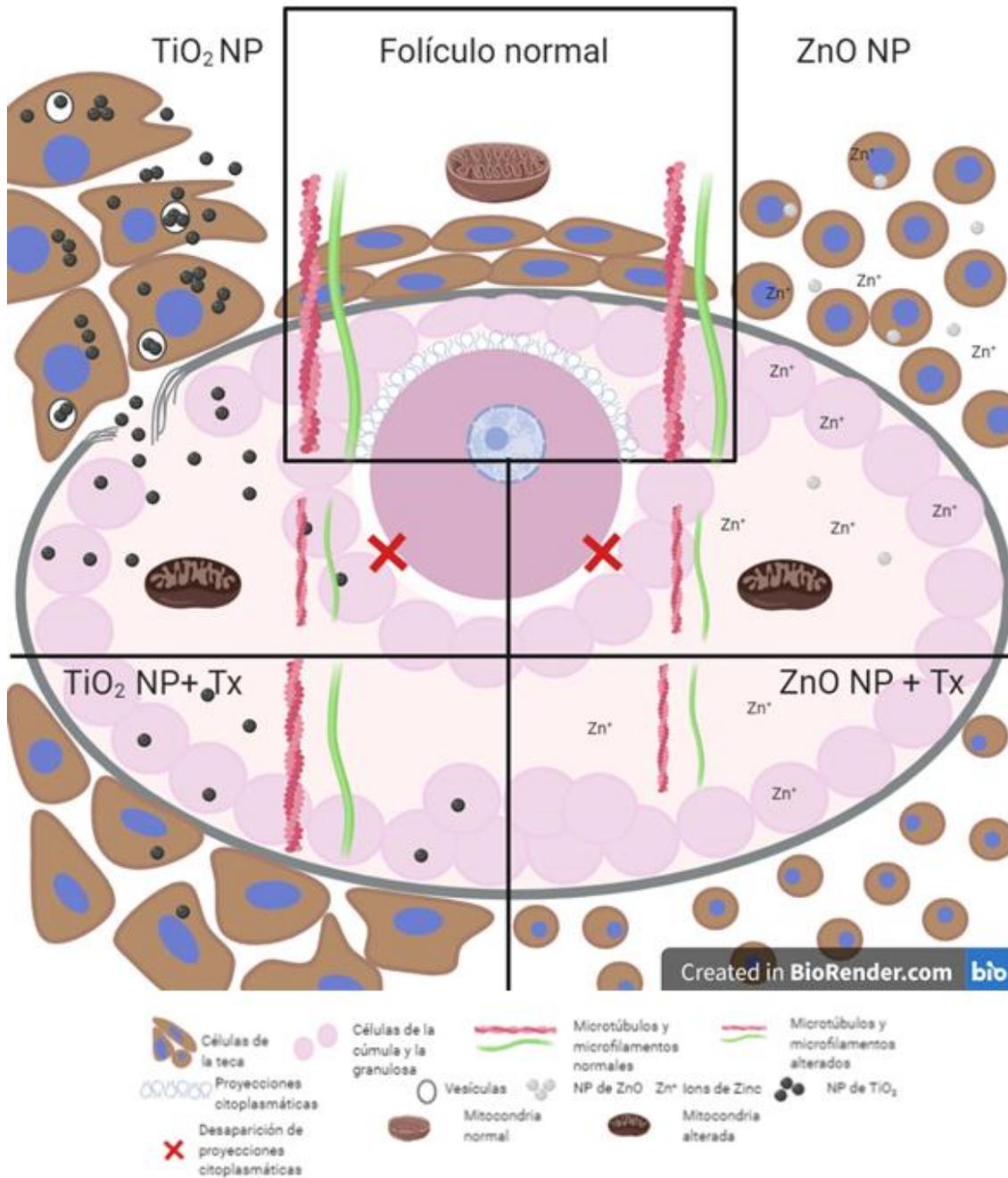


Figura 43. Efectos inducidos por las NP de TiO₂ y ZnO. Cada NP tuvo diferente comportamiento en el medio de cultivo. Las NP de TiO₂ fueron internalizadas mayoritariamente dentro de vesículas, pero también libres en el citoplasma. Las NP de ZnO se disuelven al menos parcialmente en el medio. Cada NP indujo efectos diferentes. Las NP de TiO₂ indujeron desorganización folicular, incremento en el diámetro folicular y

alteraciones en el arreglo del citoesqueleto, que fueron parcialmente prevenidas por la co-exposición con Tx. Las NP de ZnO disminuyeron el diámetro folicular, indujeron retracción celular y alteraciones en el arreglo del citoesqueleto. Ninguno de estos efectos fue disminuido en la co-exposición con Tx. Las alteraciones ultraestructurales fueron evidentes tras la exposición a ambas NP. Las mitocondrias de folículos expuestos a estos materiales fueron alteradas, así como las proyecciones citoplasmáticas en el ovocito, que no fueron observadas tras la exposición a las NP. La membrana folicular también fue afectada, evidenciado por la pérdida de la continuidad de la misma, así como por la presencia de NP en el espacio intercelular.

4.4 NP de TiO₂ y la esteroidogénesis

Para determinar el efecto de las NP de TiO₂ sobre la capacidad esteroidogénica de los folículos antrales, se cuantificaron los niveles hormonales y se evaluó la expresión de genes implicados en su síntesis. Nuestros resultados mostraron diferentes efectos con las dos concentraciones más altas, una concentración (25 µg/mL) disminuyó la expresión de genes involucrados en la síntesis de estrógenos y de la respuesta antioxidante, mientras que la otra (50 µg/mL) incrementó los niveles de las hormonas androstenediona y testosterona. Se ha descrito que el estado de agregación/aglomeración de las NP influye sobre los efectos de estos nanomateriales. En un estudio realizado con NP de plata se evaluó el efecto de la aglomeración sobre la hemólisis en muestras de sangre de caballo y se observó que el estado de agregación de las NP influye sobre su toxicidad (Zook y cols., 2011). En otro estudio también se observó que las NP de plata tienen diferente grado de toxicidad dependiendo del estado de agregación/aglomeración. En particular, evaluando la viabilidad celular en cultivos de células A549 y MRC-5 encontraron un menor efecto conforme aumentaba el tamaño de los agregados de las NP (Bélteky y cols., 2019). Teniendo lo anterior en cuenta, es posible

que las diferencias en los efectos observados con las distintas concentraciones de NP de TiO₂ puedan relacionarse con las diferencias que observamos en el estado de aglomeración de los materiales. Sin embargo, parece poco probable dado que la diferencia en el tamaño de los agregados podría ser pequeña como para influir de manera importante.

Recientemente han surgido estudios que han encontrado asociación entre la exposición a las NP y efectos adversos como respuesta inmune alterada, inflamación, fibrosis, enfisema y formación de tumores. Además, que se sugiere un papel de las NP como disruptores endocrinos en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2, de acuerdo con lo revisado por Priyam Ayusi y *cols.* (2018). En otro trabajo de revisión también se resalta el potencial como disruptor endocrino de algunas NP. Ese trabajo resume los efectos en el sistema endocrino que van desde alteraciones en la función tiroidea, la señalización de insulina y metabolismo y alteraciones en el sistema neuroendocrino, entre otros (Iavicoli y *cols.*, 2013). Finalmente, la capacidad de las NP como potenciales disruptores endocrinos se ha observado porque pueden favorecer la acumulación de estrógenos en las células de la granulosa, e incrementar la testosterona en sangre de ratones expuestos *in vivo* (Caballero-Díaz y Valcárcel, 2014). La evidencia científica acumulada en torno a los disruptores endocrinos ha mostrado que estos compuestos son capaces de ejercer efectos a bajas concentraciones que no se observan a altas concentraciones, así como un comportamiento dosis-respuesta no monotónico (relación no lineal entre la dosis y el efecto, donde la pendiente de la curva cambia de signo en algún punto dentro de las dosis examinadas) (Vandenberg y *cols.*, 2012). Lo anterior sugiere que los efectos observados en este estudio a 25 y 50 µg/mL de NP de TiO₂ pueden estar relacionadas con la capacidad de estas NP de actuar como disruptores endocrinos.

La concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ de NP de TiO_2 mostró una disminución en la expresión del gen antiapoptótico *Bcl2* y un consecuente incremento en la relación *Bax/Bcl2*, sugiriendo una inducción de apoptosis. De igual manera, los niveles de mRNA de *Cyp1b1*, *ER1*, *AR1*, *SOD1* y *GPX* disminuyeron significativamente, comparado con el grupo control. La disminución en la expresión de estos genes podría deberse a la inducción de apoptosis en los folículos antrales expuestos a esta concentración de NP de TiO_2 . Se ha descrito que las NP pueden, directa o indirectamente, interactuar con distintos receptores y activarlos o provocar distintas respuestas en las células (Lara y cols., 2017; Stöckmann y cols., 2018). Es probable que en nuestro estudio las NP de TiO_2 (25 $\mu\text{g/mL}$) estén interactuando con el ER1, desensibilizando a las células del folículo antral al estímulo de los estrógenos y como consecuencia las células podrían activar vías apoptóticas de muerte celular. Lo anterior se sustenta en algunos estudios que se citan a continuación. En un estudio con CG, en las cuales se indujo apoptosis, se observó un papel protector del E_2 de manera dependiente de la dosis (Quirk y cols., 2006). En otro estudio se observó una inducción en la expresión de *Bcl2* (antiapoptótico) en presencia de E_2 (Lewis-Wambi y Jordan, 2009). Sin embargo, también es probable que la desensibilización a los estrógenos por parte del folículo antral sea consecuencia de una disminución en la expresión del *ER1*. Se ha descrito que la exposición a las NP de TiO_2 modifica la expresión de receptores, tal como lo demostraron Rueda-Romero y cols. (2016) en células U937, quienes usando concentraciones desde 0.03 $\mu\text{g/mL}$ observaron la inducción en la expresión de receptores de moléculas de adhesión.

En nuestro estudio, la exposición a NP de TiO_2 en la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ favoreció la acumulación de andrógenos en los folículos antrales. Es probable que mediante un mecanismo que no queda claro hasta ahora, se afecte la capacidad de las CG para internalizar

a los andrógenos y convertirlos a estrógenos, o que la actividad de la aromatasa se afecte y por ello veamos acumulación de andrógenos. Sin embargo, la primera posibilidad parece más plausible, ya que si se afectara la actividad del *Cyp19a1* esperaríamos ver una disminución en los niveles de E₂, lo que no sucedió. Por ello, es probable que, mediante un mecanismo desconocido, esta exposición esté afectando la capacidad de las CG para usar los andrógenos como sustrato del *Cyp19a1*, y que esto resulte en la acumulación de androstenediona y testosterona que observamos.

Otra posibilidad es que la exposición a esta concentración de NP haya afectado a las proteínas que se encuentran involucradas en la síntesis de andrógenos, favoreciendo un incremento en la concentración de proteína y/o de su actividad, sin que esto se observara como un cambio en los niveles de mRNA. Recientemente se ha estudiado la capacidad de algunas NP para modular la actividad de diferentes enzimas con potencial aplicación industrial (Arsalan y Younus, 2018). Se sabe que las hormonas e intermediarios que se generan funcionan como reguladores positivos y/o negativos del proceso esteroideogénico, modificando la expresión de genes y receptores (LaBarbera, 2010). El *Lhcgr* es de suma importancia ya que se ha establecido que la unión con su ligando (LH) en las células de la teca promueve la síntesis de estrógenos en el folículo antral (Hernández-Ochoa y cols., 2018), mientras que el *REI* es importante para procesos como la proliferación celular. Es probable que la acumulación de andrógenos haya resultado en una retroalimentación negativa, provocando la disminución de la expresión del *Lhcgr* y del *ERI* en las células de la teca para desensibilizar a las células del estímulo hormonal y disminuir la síntesis de andrógenos. Por otro lado, aunque se observó una disminución en los niveles del mRNA del *Hsd3b1*, que participa en la síntesis de andrógenos, probablemente como resultado de la disminución del *Lhcgr*, también se observó

un incremento en los niveles del *Cyp17a1*. Es probable que la exposición haya incrementado la expresión del *Cyp17a1* dado que, debido a la disminución del *Lhcgr*, se esperaba una disminución del mRNA de los genes de la síntesis de andrógenos en las células de la teca.

4.5 NP de ZnO y la esteroidogénesis

Cuando se evaluó el efecto de las NP de ZnO sobre la capacidad esteroidogénica de los folículos antrales, se encontró un efecto definido a la concentración más baja (5 µg/mL), que promovió la acumulación de E₂, probablemente debido a la inducción del *Cyp19a1* y a la disminución del *Cyp11b1*, siendo la única concentración que mostró un efecto sobre el proceso de esteroidogénesis.

El zinc regula la expresión de genes que participan en la esteroidogénesis. Un estudio evidenció el papel del zinc en el metabolismo de andrógenos y en la aromatización al mostrar una disminución en los niveles de E₂ y de LH en suero de ratas alimentadas con una dieta deficiente de zinc, así como una disminución de receptores de andrógenos y un incremento de receptores a estrógenos en hígado (Om y Chung, 1996). En otro estudio con embriones de pez zebra como modelo, el zinc tuvo un efecto de inducción en la expresión de la aromatasa después de la disminución provocada por el cadmio (Chouchene y cols., 2016). Recientemente, otro estudio estableció que el zinc participa en la regulación de sus propios transportadores (ZnT7) en las células de Leydig, cuyo transportador co-localiza con *StAR* y, además, se observó que los niveles de zinc (regulados por ZnT7) regulan la expresión de los genes *Cyp11a1* y *hsd3b*, afectando, en consecuencia, los niveles de testosterona (Chu y cols., 2016).

En conjunto, estos resultados sugieren un papel del zinc en la regulación de la esteroidogénesis, y apoyan la observación de que en este trabajo la exposición a las NP de ZnO a la concentración de 5 µg/mL indujo la expresión del *Cyp19a1* y disminuyó la de *Cyp11b1*, favoreciendo el incremento y acumulación del E₂. Por otro lado, a esta concentración también observamos una disminución en la expresión del *ERI*. Esto se puede entender como consecuencia del incremento en los niveles de E₂ en el sistema.

En un estudio se evaluó el efecto del E₂ sobre la expresión del RE en el útero de ratas. El estudio mostró que la administración de E₂ en ratas inmaduras ovariectomizadas produjo efectos distintos conforme pasa el tiempo. Se observó una disminución en los niveles del RE a las 3 h, un incremento del mRNA a las 24 h y una posterior disminución a las 72 h (Nephew y cols., 2000), mostrando la importancia que tiene el tiempo de evaluación sobre los resultados. Además del tiempo de evaluación, la edad es un factor importante en la regulación diferencial de los niveles del ER. Aunque ese estudio se realizó en un modelo *in vivo* y en células de tejido uterino, es un buen ejemplo que ilustra el papel regulador, tanto de manera positiva como negativa, de la expresión de los receptores de estrógenos. Considerando esos hallazgos, es probable que la acumulación de E₂, evaluada a las 96 h en el presente estudio, haya resultado en una regulación negativa en la expresión del *ERI* y que por eso hayamos observado una disminución en su mRNA. Otro estudio *in vivo*, empleando ratas adultas expuestas a NP de ZnO, encontró un incremento en los niveles de E₂ y progesterona en el suero a bajas dosis (4 y 8 mg/kg) y una disminución a altas concentraciones (100 y 200 mg/kg) (Hosseini y cols., 2019), lo que coincide con los resultados de nuestro modelo *in vitro*. Otra vía de regulación que podría explicar nuestra observación de la disminución en los niveles de mRNA del *ERI* está relacionada con la estabilidad de la molécula. En un

estudio con células MCF-7 se observó que la exposición durante 6 h a E₂ (10⁻⁹ M) resultó en una disminución en el tiempo de vida media del mRNA del ER, que pasó de 4 h a 40 min (Saceda y cols., 1998).

La síntesis de estrógenos es regulada principalmente a nivel transcripcional. Las células esteroidogénicas no almacenan esteroides, por lo que requieren de una respuesta esteroidogénica rápida para la síntesis de los mismos (Bremer y Miller, 2014). En el presente trabajo, al determinar la expresión de genes implicados en la esteroidogénesis observamos cambios que, aunque fueron estadísticamente significativos, fueron sutiles respecto al control. Lo anterior podría hacer pensar que estos cambios no sean biológicamente relevantes. Sin embargo, algunos de estos cambios demuestran su relevancia biológica a pesar de ser tan pequeños. Por ejemplo, los cambios en la expresión de *Cyp19a1* y *Cyp11a1*, cuyo incremento y disminución en los niveles del mRNA coinciden con el incremento de E₂ observados en el grupo expuesto a ZnO 5 µg/mL, apoyando la relevancia biológica de cambios en el mRNA que podrían considerarse sutiles. Además, un estudio evaluó la importancia de cambios pequeños en los niveles de mRNA. Utilizando secuenciación del RNA (*high-throughput single-molecule sequencing* (SMS) of RNA (RNAseq)) se analizó el curso temporal del proceso inflamatorio empleando ratones expuestos a lipopolisacárido durante varias horas, generando evidencia de que los cambios pequeños en los niveles de RNA tienen relevancia biológica y no deben ser ignorados (St Laurent y cols., 2013). Este estudio argumenta además las razones por las cuales podrían ocurrir estos cambios pequeños pero significativos en los niveles de RNA, ya que consideran la complejidad de los tejidos y que en ellos se encuentran diferentes tipos celulares (como en el folículo antral) cuya respuesta a los estímulos puede variar de manera importante.

4.6 NP y estrés oxidante

La evaluación de la inducción de estrés oxidante después de la exposición a NP en nuestro sistema se abordó mediante distintas evaluaciones. Los acercamientos empleados fueron mediante la co-exposición de NP con un antioxidante (Tx) en algunas de las evaluaciones, la respuesta antioxidante del folículo antral cuantificando la expresión de enzimas antioxidantes y finalmente, mediante la cuantificación de los niveles de ROS.

Cuando se evaluó la inducción de estrés oxidante en los folículos expuestos a NP de TiO₂ se observó que la co-exposición con Tx protegió de las alteraciones inducidas por las NP sobre el diámetro folicular, la morfología y el arreglo del citoesqueleto, así como disminución en la defensa antioxidante (evidenciado por la disminución de la expresión de enzimas antioxidantes), sugiriendo la participación de las ROS en los efectos observados. Teniendo lo anterior en cuenta, es probable que las NP estén generando estrés oxidante y que éste afecte directamente la dinámica del citoesqueleto cuya consecuencia final se refleje en la alteración en la morfología y el diámetro del folículo. Lo anterior se sustenta en los siguientes estudios. Se ha descrito que la exposición a NP de TiO₂ (5 a 50 µg/mL) en un sistema acelular es capaz de afectar la polimerización de tubulina (Gheshlaghi y cols., 2008). También se ha descrito que la capacidad de las NP de ZnO (100 µg/mL durante 5 h) para afectar el arreglo del citoesqueleto de células HaCat y células HeLa, da como resultado cambios estructurales en los microtúbulos (García-Hevia et al., 2016). Otros estudios han descrito la capacidad de otras NP para afectar el arreglo del citoesqueleto, como se ilustra en una reciente revisión, donde se describe la capacidad de NP de SiO₂, Ag, ZnO, nanotubos de carbón, nanofibras de grafito y NP de óxido de hierro, entre otras (Ispanixtlahuatl-Meráz y cols., 2018). Por otro lado, se ha descrito la regulación vía redox de componentes del citoesqueleto. Por ejemplo,

se ha descrito que la actina y tubulina son susceptibles a oxidación en residuos de cisteína y metionina, que puede resultar en disminución de la polimerización/elongación, catástrofe de microtúbulos etc. (Wilson y González-Billault, 2015; Xu y cols., 2017). Lo anterior permite sugerir una relación entre exposición a NP, generación de ROS y alteración en la dinámica del citoesqueleto y proponer que la exposición a NP induce estrés oxidante y favorece alteraciones en la dinámica del citoesqueleto vía oxidación de sus componentes.

Para confirmar la posible participación del estrés oxidante en los efectos descritos se cuantificaron los niveles de ROS/RNS a diferentes tiempos de exposición a las NP de TiO₂ (25 µg/mL). Nuestros resultados no muestran la presencia de niveles elevados de especies reactivas en los tiempos evaluados (48, 72 y 96 h). Es probable que los tiempos elegidos estén fuera de la ventana de formación y desaparición de especies reactivas y que debido a su corto tiempo de vida media hayan desaparecido antes de ser detectados. Se ha descrito que el O₂⁻ tiene una vida media de 10⁻⁹ a 10⁻¹¹ seg, mientras que el H₂O₂ una vida media de 10⁻³ seg (Taverne y cols., 2013). Un estudio evaluó la formación de ROS por exposición a NP de TiO₂ y encontró que sucede a tiempos tan cortos como 10 min, con un máximo a las 4 h de exposición (Rueda-Romero y cols., 2016). Por otro lado, en el trabajo de George y cols. (2010), así como en el de Xia y cols., quienes emplearon las mismas NP que se utilizaron en este estudio, no se observó generación de ROS por la exposición de células BEAS-2B y RAW 264.7 a NP de TiO₂ (6.125 - 50 µg/mL) por lo que los autores sugieren que no hay inducción de estrés oxidante y los efectos observados se atribuyen a otros mecanismos de toxicidad involucrados.

Teniendo lo anterior en consideración y nuestros resultados tanto de la evaluación de estrés oxidante como del efecto de estas NP sobre la síntesis de estrógenos, la generación de ROS

parece estar influyendo en los efectos observados sobre la morfología y diámetro folicular, como consecuencia de un efecto directo de las ROS sobre el citoesqueleto. Sin embargo, los efectos sobre la síntesis de hormonas parecen no tener relación con la formación de ROS, sino con los factores anteriormente discutidos. Por ello, es probable que estemos observando efectos desencadenados por distintos mecanismos de toxicidad.

Cuando analizamos la inducción de estrés oxidante en folículos antrales por exposición a NP de ZnO encontramos que a las 96 h hubo inducción de la respuesta oxidante con la concentración de 15 µg/mL, evidenciada por inducción de la expresión de varias enzimas antioxidantes, que resultaron en la disminución de los niveles de ROS en este grupo. Por otro lado, al evaluar el papel del Tx, observamos que tiene un efecto sobre el diámetro folicular, impidiendo la recuperación en el diámetro del folículo y que no fue capaz de proteger del efecto sobre la morfología del folículo antral, que se observó cuando los folículos se expusieron solo a las NP. Lo anterior sugiere un papel toxico potenciado por el Tx que podría estar relacionado con un efecto prooxidante.

Se ha descrito que el ion zinc puede actuar como un prooxidante como resultado de alteraciones en el metabolismo celular y funciones mitocondriales relacionadas con la cadena de transporte de electrones (Lee, 2018). Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* han evidenciado la capacidad del zinc como ion o como NP para afectar el balance oxidante. En un estudio realizado en un cultivo primario de astrocitos expuestos a acetato de zinc se observó la inactivación de la enzima glutatión reductasa, un incremento en los niveles de GSSH:GSH y un incremento de ROS a concentraciones superiores a 150 µM de zinc (Bishop y cols., 2007). Mientras que, en otro estudio se observó una inducción de ROS y disminución en el mRNA de enzimas antioxidantes (SOD2, CAT, GPX1) desde 1 y hasta 24 h de exposición usando 2

tipos distintos de NP de ZnO (25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en células SHSY5Y (Liu y cols., 2017). Por otro lado, un estudio reportó la generación de ROS en peces, después de ser expuestos durante 10 días a NP de ZnO (300 y 1000 mg/kg) (Connolly y cols., 2016). En conjunto, estos estudios sugieren que a las 96 h de exposición a las NP de ZnO en este estudio se puede estar induciendo la formación de ROS y la respuesta antioxidante. Estos efectos podrían al menos en parte relacionarse con la liberación de iones de zinc que se observó en nuestro sistema.

En el estudio de Shen y cols. (Shen y cols., 2013), usando células del sistema inmune como modelo, los autores reportaron que el uso de un antioxidante no protegió del daño inducido por la exposición a NP de ZnO (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 h), sugiriendo que la generación de ROS es el resultado del daño y no el mecanismo de toxicidad. Por otro lado, se ha demostrado que las NP de ZnO tienen un potencial tóxico mayor que las NP de TiO_2 (George y cols., 2010; Xia y cols., 2008). En el presente estudio, usando concentraciones menores a la mitad de las utilizadas de NP de TiO_2 , observamos efectos tóxicos importantes con las NP de ZnO. Una mayor toxicidad podría tener como consecuencia la inducción de mayor cantidad de ROS, excediendo la capacidad antioxidante del Tx, lo que podría explicar que no hayamos observado un papel protector del mismo. Sin embargo, esta posibilidad no parece ser la que predomine de acuerdo con nuestros resultados que sugieren inducción de ROS cerca del fin del cultivo.

El Tx podría tener un comportamiento como agente prooxidante en el sistema, exacerbando los efectos de las NP de ZnO. El trolox es un antioxidante soluble en agua cuya actividad antioxidante ha sido ampliamente documentada. Su mecanismo de acción se ha asociado a la capacidad de captar y reducir radicales, así como actuar en sinergia con otros antioxidantes debido a la presencia del grupo OH en su estructura (Albertini y Abuja, 1999). En un estudio,

evaluando el efecto del Tx en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés: **low density lipoprotein**) inducida por Cu^{2+} se propuso que el Tx puede actuar como antioxidante gracias a que favorece la reducción del tocoferol oxidado permitiendo su actividad antioxidante en el ambiente lipofílico (Albertini y Abuja, 1999). El mismo estudio también observó un mayor efecto antioxidante del Tx cuando lo agregaron después de 15 y 25 min del inicio de la incubación que cuando lo agregaron al tiempo cero. Con esos resultados, los autores sugirieron que la actividad antioxidante del Tx es mayor cuando hay baja formación de radicales y el tocoferol (reducido) se encuentra aún presente.

Otro estudio observó un efecto bifásico del Tx dependiente de la concentración en la peroxidación lipídica inducida por Fe^{3+} sugiriendo que el efecto prooxidante del Tx puede estar relacionado con su habilidad de estimular ciclos redox del hierro (Ko y cols., 1994). Aunque el zinc es un ion divalente estable que no participa directamente en reacciones de oxido-reducción (Lee, 2018), se ha descrito que el zinc influye importantemente en la homeostasis del hierro debido a una estrecha relación entre factores que los regulan (Knez y cols., 2017). Además, diversos estudios han mostrado que la exposición a diferentes NP es capaz de interferir con la homeostasis de metales esenciales (Gao y cols., 2012; Minghetti y Schirmer, 2019).

En resumen, es probable que la exposición a la concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$ de NP de ZnO resulte en la inducción de estrés oxidante hasta las 96 h de exposición. Por otro lado, la co-exposición de Tx con las NP de ZnO parece resultar en la formación de ROS e inducción de estrés oxidante a tiempos más cortos debido a que la liberación de iones puede estar afectando la homeostasis de metales como el hierro y que a su vez el contacto de los metales con el Tx esté favoreciendo reacciones de oxido reducción que lleven a la generación de ROS.

Finalmente, analizando en conjunto los resultados de este trabajo, queda claro el impacto tóxico de los materiales evaluados y la necesidad de realizar más estudios que contribuyan a la comprensión de sus efectos. También queda clara la importancia de la adecuada caracterización, ya que en el presente estudio también observamos que los parámetros fisicoquímicos de las NP como el tamaño, diámetro, agregación/aglomeración, disolución etc., impactan importantemente en los efectos, comportamiento y toxicidad de los nanomateriales. En este trabajo, las NP de TiO₂ parecen afectar la morfología y el arreglo del citoesqueleto mediante un mecanismo relacionado con la generación de ROS. Esta hipótesis se basa en que estos efectos desaparecen con la co-exposición con Tx. Por otro lado, los efectos de las NP de ZnO también podrían estar relacionados con la generación de ROS y con el papel prooxidante del Tx. Sin embargo, se requiere de más estudios para concluir la participación de las ROS en los efectos observados por la exposición a ambas NP. Los efectos de las NP de TiO₂ sobre la capacidad esteroidogénica podrían estar relacionados con características como el tamaño y el estado de aglomeración/agregación. Por otro lado, las NP de ZnO a una concentración baja tienen un marcado efecto promotor de la esteroidogénesis, relacionado probablemente con el importante rol fisiológico del ion, mientras que a una concentración alta inducen la respuesta antioxidante del folículo, evidenciando su capacidad para generar ROS.

5 Conclusiones

- 1- Las NP evaluadas tienen comportamiento y efectos diferentes en el sistema del cultivo de folículos antrales.
- 2- Las características fisicoquímicas de las NP tienen gran importancia en los efectos que ejercen en los folículos antrales.
- 3- Ambas NP afectan el diámetro folicular a pesar de poseer características fisicoquímicas diferentes.
- 4- Los efectos de las NP de TiO₂ y ZnO sobre el diámetro y morfología se relacionan con las alteraciones en la organización del citoesqueleto y solamente los efectos de las NP de TiO₂ se previenen con la co-exposición con el antioxidante Tx.
- 5- Ambas NP alteraron la ultraestructura del folículo antral, así como las proyecciones citoplasmáticas que comunican al ovocito con las células que lo rodean.
- 6- Las NP de TiO₂ ejercen efectos diferentes sobre la esteroidogénesis de los folículos antrales, probablemente debido a efectos relacionados con el estado de agregación/aglomeración y a su potencial como disruptor endocrino.
- 7- Las NP de ZnO ejercen efectos diferenciados a concentraciones bajas y altas, favoreciendo la síntesis de estrógenos a baja concentración y la respuesta antioxidante de los folículos antrales a alta concentración.
- 8- Aunque se sugiere, las concentraciones y tiempos empleados de exposición a NP en este estudio, no permitieron concluir la participación de las ROS.
- 9- Es de suma importancia considerar las características fisicoquímicas de las NP, ya que permite determinar efectos compartidos, pero también efectos particulares debidos a las características fisicoquímicas.

6 Perspectivas

Con los resultados de este trabajo sobre los efectos de las NP de TiO₂ y de ZnO a nivel reproductivo femenino se plantea:

- 1- Determinar la dosimetría de las NP en las células para establecer una relación entre los tiempos de ingreso de las NP y los efectos observados.
- 2- Evaluar el efecto de ambas NP sobre la comunicación mediada por uniones gap entre el ovocito y las células que lo rodean.
- 3- Determinar la funcionalidad y calidad de los ovocitos por la exposición a NP mediante la realización de ensayos de fertilización *in vivo* e *in vitro* y de desarrollo del cigoto.
- 4- Determinar el efecto de las NP de TiO₂ como disruptores de la membrana basal evaluando la integridad y permeabilidad de la misma mediante la expresión de proteínas de uniones estrechas como ZO-1, ocludina, entre otras.
- 5- Determinar si existe un efecto directo de las NP sobre el citoesqueleto para esclarecer su papel sobre el diámetro y morfología folicular.
- 6- Determinar el papel de las NP de TiO₂ como disruptor endocrino evaluando los efectos sobre la esteroidogénesis empleando un mayor número de concentraciones.
- 7- Profundizar sobre los mecanismos y el impacto en la calidad del folículo antral de la exposición a bajas concentraciones de NP de ZnO
- 8- Realizar evaluaciones sobre el impacto en la síntesis de estrógenos y generación de ROS de ambas NP a tiempos más cortos para determinar con certeza el papel de las ROS en dichos efectos

7 Bibliografía

Abbasalipourkabar, R., Moradi, H., Zarei, S., Asadi, S., Salehzadeh, A., Ghafourikhosroshahi, A., Mortazavi, M., & Ziamajidi, N. (2015). Toxicity of zinc oxide nanoparticles on adult male Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 154-160. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.019>

Acuña-Hernández, D. G., Arreola-Mendoza, L., Santacruz-Márquez, R., García-Zepeda, S. P., Parra-Forero, L. Y., Olivares-Reyes, J. A., & Hernández-Ochoa, I. (2018). Bisphenol A alters oocyte maturation by prematurely closing gap junctions in the cumulus cell-oocyte complex. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 344, 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.011>

Akhtar, K., Khan, S. A., Khan, S. B., & Asiri, A. M. (2018). Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. En S. K. Sharma (Ed.), *Handbook of Materials Characterization* (pp. 113-145). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_4

Albertini, R., & Abuja, P. M. (1999). Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Research*, 30(3), 181-188. <https://doi.org/10.1080/10715769900300201>

An, S. S. A., Choi, S.-J., & Choy, J.-H. (2014). Biokinetics of zinc oxide nanoparticles: Toxicokinetics, biological fates, and protein interaction. *International Journal of Nanomedicine*, 261. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57920>

Andersen, C. Y., & Ezcurra, D. (2014). Human steroidogenesis: Implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *12*, 128. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-128>

Arsalan, A., & Younus, H. (2018). Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 1833-1847. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030>

Baena, V., & Terasaki, M. (2019). Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle. *Scientific Reports*, *9*(1), 1262. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37766-2>

Barkhordari, A., Hekmatimoghaddam, S., Jebali, A., Khalili, M. A., Talebi, A., & Noorani, M. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, *11*(9), 767-771.

Barnett, K. R., Schilling, C., Greenfeld, C. R., Tomic, D., & Flaws, J. A. (2006). Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction Update*, *12*(5), 537-555. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml022>

Beck, M. T., Peirce, S. K., & Chen, W. Y. (2002). Regulation of bcl-2 gene expression in human breast cancer cells by prolactin and its antagonist, hPRL-G129R. *Oncogene*, *21*(33), 5047-5055. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205637>

Bedi, P. S., & Kaur, A. (2015). An overview on uses of zinc oxide nanoparticles. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *4*(12), 1177-1196.

Bélteky, P., Rónavári, A., Igaz, N., Szerencsés, B., Tóth, I. Y., Pfeiffer, I., Kiricsi, M., & Kónya, Z. (2019). Silver nanoparticles: Aggregation behavior in biorelevant conditions and

its impact on biological activity. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 667-687.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S185965>

Bishop, G. M., Dringen, R., & Robinson, S. R. (2007). Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(8), 1222-1230.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.022>

Bremer, A. A., & Miller, W. L. (2014). Chapter 13—Regulation of Steroidogenesis. En A. Ulloa-Aguirre & P. M. Conn (Eds.), *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (pp. 207-227). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408134-5.00013-5>

Bruinink, A., Wang, J., & Wick, P. (2015). Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. *Archives of Toxicology*, 89(5), 659-675. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1460-6>

Caballero-Díaz, E., & Valcárcel, M. (2014). Chapter 5—Toxicity of Gold Nanoparticles. En M. Valcárcel & Á. I. López-Lorente (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 66, pp. 207-254). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63285-2.00005-5>

Cargnello, M., Gordon, T. R., & Murray, C. B. (2014). Solution-Phase Synthesis of Titanium Dioxide Nanoparticles and Nanocrystals. *Chemical Reviews*, 114(19), 9319-9345. <https://doi.org/10.1021/cr500170p>

Cell-particle interactions—Latest research and news | Nature. (s. f.). Recuperado 4 de febrero de 2021, de <https://www.nature.com/subjects/cell-particle-interactions>

Cho, W.-S., Duffin, R., Thielbeer, F., Bradley, M., Megson, I. L., MacNee, W., Poland, C. A., Tran, C. L., & Donaldson, K. (2012). Zeta Potential and Solubility to Toxic Ions as

Mechanisms of Lung Inflammation Caused by Metal/Metal Oxide Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 126(2), 469-477. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs006>

Choi, S.-J., & Choy, J.-H. (2014). Biokinetics of zinc oxide nanoparticles: Toxicokinetics, biological fates, and protein interaction. *International Journal of Nanomedicine*, 9 Suppl 2, 261-269. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57920>

Chouchene, L., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Hinfrey, N., Brion, F., Piccini, B., Kah, O., Saïd, K., Messaoudi, I., & Pakdel, F. (2016). Inhibitory effect of cadmium on estrogen signaling in zebrafish brain and protection by zinc. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 36(6), 863-871. <https://doi.org/10.1002/jat.3285>

Chu, Q., Chi, Z.-H., Zhang, X., Liang, D., Wang, X., Zhao, Y., Zhang, L., & Zhang, P. (2016). A potential role for zinc transporter 7 in testosterone synthesis in mouse Leydig tumor cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(6), 1619-1626. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2576>

Clarke, H. J. (2018). Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *WIREs Developmental Biology*, 7(1), e294. <https://doi.org/10.1002/wdev.294>

Connolly, M., Fernández, M., Conde, E., Torrent, F., Navas, J. M., & Fernández-Cruz, M. L. (2016). Tissue distribution of zinc and subtle oxidative stress effects after dietary administration of ZnO nanoparticles to rainbow trout. *Science of The Total Environment*, 551-552, 334-343. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.186>

Dan, M., Xu, L., Shao, A., Cheng, X., Zhang, C., Yokel, R., Takemura, T., Hanagata, N., Niwa, M., & Watanabe, D. (2015). Silver nanoparticles induce tight junction disruption and

astrocyte neurotoxicity in a rat blood–brain barrier primary triple coculture model.

International Journal of Nanomedicine, 6105. <https://doi.org/10.2147/IJN.S85265>

Dekel, N., Lawrence, T. S., Gilula, N. B., & Beers, W. H. (1981). Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology*, 86(2), 356-362. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90193-7)

Dekel, Nava. (2005). Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234(1-2), 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.09.010>

Docter, D., Distler, U., Storck, W., Kuharev, J., Wünsch, D., Hahlbrock, A., Knauer, S. K., Tenzer, S., & Stauber, R. H. (2014). Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles. *Nature Protocols*, 9(9), 2030-2044. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.139>

Du, Z.-J., Cui, G.-Q., Zhang, J., Liu, X.-M., Zhang, Z.-H., Jia, Q., Ng, J. C., Peng, C., Bo, C.-X., & Shao, H. (2017). Inhibition of gap junction intercellular communication is involved in silica nanoparticles-induced H9c2 cardiomyocytes apoptosis via the mitochondrial pathway. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 2179-2188. <https://doi.org/10.2147/IJN.S127904>

Ebnesajjad, S. (2014). Surface and Material Characterization Techniques. En *Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding* (pp. 39-75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-26435-8.00004-6>

El-Hayek, S., Yang, Q., Abbassi, L., FitzHarris, G., & Clarke, H. J. (2018). Mammalian Oocytes Locally Remodel Follicular Architecture to Provide the Foundation for Germline-Soma Communication. *Current Biology*, 28(7), 1124-1131.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.039>

Elsaesser, A., & Howard, C. V. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001>

Fang, Q., Shi, Q., Guo, Y., Hua, J., Wang, X., & Zhou, B. (2016). Enhanced Bioconcentration of Bisphenol A in the Presence of Nano-TiO₂ Can Lead to Adverse Reproductive Outcomes in Zebrafish. *Environmental Science & Technology*, 50(2), 1005-1013. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05024>

Gao, G., Ze, Y., Li, B., Zhao, X., Zhang, T., Sheng, L., Hu, R., Gui, S., Sang, X., Sun, Q., Cheng, J., Cheng, Z., Wang, L., Tang, M., & Hong, F. (2012). Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 243, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.049>

George, S., Pokhrel, S., Xia, T., Gilbert, B., Ji, Z., Schowalter, M., Rosenauer, A., Damoiseaux, R., Bradley, K. A., Mädler, L., & Nel, A. E. (2010). Use of a Rapid Cytotoxicity Screening Approach To Engineer a Safer Zinc Oxide Nanoparticle through Iron Doping. *ACS Nano*, 4(1), 15-29. <https://doi.org/10.1021/nn901503q>

Gheshlaghi, Z. N., Riazi, G. H., Ahmadian, S., Ghafari, M., & Mahinpour, R. (2008). Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 40(9), 777-782.

Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, *14*(2), 159-177. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>

Go, R.-E., Hwang, K.-A., & Choi, K.-C. (2015). Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *147*, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.003>

Granot, I., & Dekel, N. (2002). The ovarian gap junction protein connexin43: Regulation by gonadotropins. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *13*(7), 310-313. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(02\)00623-9](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(02)00623-9)

Han, Z., Yan, Q., Ge, W., Liu, Z.-G., Gurunathan, S., De Felici, M., Shen, W., & Zhang, X.-F. (2016). Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 5187-5203. <https://doi.org/10.2147/IJN.S111447>

Hernández-Ochoa, I., Paulose, T., & Flaws, J. A. (2018). Ovarian Toxicology. En *Comprehensive Toxicology* (pp. 341-361). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.10926-2>

Hernández-Ochoa, Isabel, Gao, L., Peretz, J., Basavarajappa, M. S., Bunting, S. L., Karman, B. N., Paulose, T., & Flaws, J. A. (2013). Follicle-stimulating hormone responsiveness in antral follicles from aryl hydrocarbon receptor knockout mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *11*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-26>

Hirshfield, A. N. (1991). Development of Follicles in the Mammalian Ovary. En K. W. Jeon & M. Friedlander (Eds.), *International Review of Cytology* (Vol. 124, pp. 43-101). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)

Hoffmann, M. R., Martin, S. T., Choi, W., & Bahnemann, D. W. (2009). Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis. *Chemical Reviews*, 95(1), 69-96. <https://doi.org/10.1021/cr00033a004>

Hong, F., Wang, Y., Zhou, Y., Zhang, Q., Ge, Y., Chen, M., Hong, J., & Wang, L. (2016). Exposure to TiO₂ Nanoparticles Induces Immunological Dysfunction in Mouse Testitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(1), 346-355. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05262>

Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., & Iwahashi, H. (2012). *In Vitro* Evaluation of Cellular Response Induced by Manufactured Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 25(3), 605-619. <https://doi.org/10.1021/tx200470e>

Hosseini, S. M., Moshrefi, A. H., Amani, R., Razavimehr, S. V., Aghajanikhah², M. H., Sokouti, Z., & Holari, B. B. (2019). Subchronic effects of different doses of Zinc oxide nanoparticle on reproductive organs of female rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 17(2), 107. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i2.3988>

Hsueh, Y.-H., Ke, W.-J., Hsieh, C.-T., Lin, K.-S., Tzou, D.-Y., & Chiang, C.-L. (2015). ZnO Nanoparticles Affect *Bacillus subtilis* Cell Growth and Biofilm Formation. *PLOS ONE*, 10(6), e0128457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128457>

Iavicoli, I., Fontana, L., Leso, V., & Bergamaschi, A. (2013). The Effects of Nanomaterials as Endocrine Disruptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16732-16801. <https://doi.org/10.3390/ijms140816732>

Ispanixtlahuatl-Meráz, O., Schins, R. P. F., & Chirino, Y. I. (2018). Cell type specific cytoskeleton disruption induced by engineered nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 5(2), 228-245. <https://doi.org/10.1039/C7EN00704C>

Jaeger, A., Weiss, D. G., Jonas, L., & Kriehuber, R. (2012). Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology*, 296(1-3), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.02.016>

Jiang, J., Oberdörster, G., & Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), 77-89. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>

Jo, E., Seo, G., Kwon, J.-T., Lee, M., Lee, B. cheun, Eom, I., Kim, P., & Choi, K. (2013). Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 38(4), 525-530. <https://doi.org/10.2131/jts.38.525>

Join the dialogue. (2012). *Nature Nanotechnology*, 7(9), 545-545. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.150>

Khalili Fard, J., Jafari, S., & Eghbal, M. A. (2015). A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), 447-454. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.061>

Kim, M.-K., Lee, J.-A., Jo, M.-R., & Choi, S.-J. (2016). Bioavailability of Silica, Titanium Dioxide, and Zinc Oxide Nanoparticles in Rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(6), 6580-6586. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12350>

Klotz, L.-O., & Steinbrenner, H. (2017). Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox Biology*, *13*, 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.015>

Knez, M., Graham, R. D., Welch, R. M., & Stangoulis, J. C. R. (2017). New perspectives on the regulation of iron absorption via cellular zinc concentrations in humans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(10), 2128-2143. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1050483>

Ko, K. M., Yick, P. K., Poon, M. K., & Ip, S. P. (1994). Prooxidant and antioxidant effects of Trolox on ferric ion-induced oxidation of erythrocyte membrane lipids. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *141*(1), 65-70. <https://doi.org/10.1007/bf00935592>

Kraemer, F. B., Khor, V. K., Shen, W.-J., & Azhar, S. (2013). Cholesterol ester droplets and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *371*(1-2), 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.10.012>

Kumar, N., Srivastava, S., & Roy, P. (2015). Impact of low molecular weight phthalates in inducing reproductive malfunctions in male mice: Special emphasis on Sertoli cell functions. *General and Comparative Endocrinology*, *215*, 36-50. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.012>

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

LaBarbera, A. R. (2010). Differentiation and Function of the Female Reproductive System. En *Comprehensive Toxicology* (pp. 347-366). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01121-0>

Lara, S., Alnasser, F., Polo, E., Garry, D., Lo Giudice, M. C., Hristov, D. R., Rocks, L., Salvati, A., Yan, Y., & Dawson, K. A. (2017). Identification of Receptor Binding to the Biomolecular Corona of Nanoparticles. *ACS Nano*, *11*(2), 1884-1893. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07933>

LaVoie, H. A. (2017). Transcriptional control of genes mediating ovarian follicular growth, differentiation, and steroidogenesis in pigs. *Molecular Reproduction and Development*, *84*(9), 788-801. <https://doi.org/10.1002/mrd.22827>

Lee, I.-K., & Rhee, S.-K. (2007). Inhibitory effect of Bisphenol A on gap junctional intercellular communication in an epithelial cell line of rat mammary tissue. *Archives of Pharmacal Research*, *30*(3), 337. <https://doi.org/10.1007/BF02977615>

Lee, S. R. (2018). Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/9156285>

Lei, R., Bai, X., Chang, Y., Li, J., Qin, Y., Chen, K., Gu, W., Xia, S., Zhang, J., Wang, Z., & Xing, G. (2018). Effects of Fullerenol Nanoparticles on Rat Oocyte Meiosis Resumption. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 699. <https://doi.org/10.3390/ijms19030699>

Lewis-Wambi, J. S., & Jordan, V. C. (2009). Estrogen regulation of apoptosis: How can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Research*, *11*(3), 206. <https://doi.org/10.1186/bcr2255>

Li, C.-H., Shyu, M.-K., Jhan, C., Cheng, Y.-W., Tsai, C.-H., Liu, C.-W., Lee, C.-C., Chen, R.-M., & Kang, J.-J. (2015). Gold Nanoparticles Increase Endothelial Paracellular Permeability by Altering Components of Endothelial Tight Junctions, and Increase Blood-Brain Barrier Permeability in Mice. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *148*(1), 192-203. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv176>

Liu, J., Kang, Y., Yin, S., Song, B., Wei, L., Chen, L., & Shao, L. (2017). Zinc oxide nanoparticles induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size-dependent manner. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 8085-8099. <https://doi.org/10.2147/IJN.S149070>

Liu, X.-Q., Zhang, H.-F., Zhang, W.-D., Zhang, P.-F., Hao, Y.-N., Song, R., Li, L., Feng, Y.-N., Hao, Z.-H., Shen, W., Min, L.-J., Yang, H.-D., & Zhao, Y. (2016). Regulation of neuroendocrine cells and neuron factors in the ovary by zinc oxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, *256*, 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.05.007>

Ma, H., Williams, P. L., & Diamond, S. A. (2013). Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – A review. *Environmental Pollution*, *172*, 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.08.011>

Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., & Kurokawa, M. (2016). Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *327*, 43-87. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.006>

- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200-214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585-594. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205074>
- Meena, R., Kajal, K., & R., P. (2015). Cytotoxic and Genotoxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Testicular Cells of Male Wistar Rat. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(2), 825-840. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1299-y>
- Microtubules, Filaments | Learn Science at Scitable.* (s. f.). Recuperado 2 de diciembre de 2020, de <https://www.nature.com/scitable/topicpage/microtubules-and-filaments-14052932/>
- Minghetti, M., & Schirmer, K. (2019). Interference of silver nanoparticles with essential metal homeostasis in a novel enterohepatic fish in vitro system. *Environmental Science: Nano*, 6(6), 1777-1790. <https://doi.org/10.1039/C9EN00310J>
- Misra, S. K., Dybowska, A., Berhanu, D., Luoma, S. N., & Valsami-Jones, E. (2012). The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Science of The Total Environment*, 438, 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.066>
- Mori, H., & Cardiff, R. D. (2016). Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. En J. Ursini-Siegel & N. Beauchemin (Eds.), *The Tumor Microenvironment* (Vol. 1458, pp. 1-12). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3801-8_1
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

Murthy, S. K. (2007). Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *International Journal of Nanomedicine*, 2(2), 129-141.

Murugadoss, S., Brassinne, F., Sebaihi, N., Petry, J., Cokic, S. M., Van Landuyt, K. L., Godderis, L., Mast, J., Lison, D., Hoet, P. H., & van den Brule, S. (2020). Agglomeration of titanium dioxide nanoparticles increases toxicological responses in vitro and in vivo. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00341-7>

Nephew, K. P., Long, X., Osborne, E., Burke, K. A., Ahluwalia, A., & Bigsby, R. M. (2000). Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. *Biology of Reproduction*, 62(1), 168-177. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.168>

Nguyen, J. N. T., & Harbison, A. M. (2017). Scanning Electron Microscopy Sample Preparation and Imaging. En V. Espina (Ed.), *Molecular Profiling* (Vol. 1606, pp. 71-84). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_5

Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2020). Metal Oxide Nanoparticles as Biomedical Materials. *Biomimetics* (Basel, Switzerland), 5(2). <https://doi.org/10.3390/biomimetics5020027>

Nohynek, G. J., & Dufour, E. K. (2012). Nano-sized cosmetic formulations or solid nanoparticles in sunscreens: A risk to human health? *Archives of Toxicology*, 86(7), 1063-1075. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0831-5>

OM, A.-S., & Chung, K.-W. (1996). Dietary Zinc Deficiency Alters 5 α -Reduction and Aromatization of Testosterone and Androgen and Estrogen Receptors in Rat Liver. *The Journal of Nutrition*, 126(4), 842-848. <https://doi.org/10.1093/jn/126.4.842>

Patel, S., Peretz, J., Pan, Y.-X., Helferich, W. G., & Flaws, J. A. (2016). Genistein exposure inhibits growth and alters steroidogenesis in adult mouse antral follicles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 293, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.026>

Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6), 947-970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>

Peretz, J., Neese, S. L., & Flaws, J. A. (2013). Mouse Strain Does Not Influence the Overall Effects of Bisphenol A-Induced Toxicity in Adult Antral Follicles¹. *Biology of Reproduction*, 89(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111864>

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., & Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9), 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>

Powers, K. W., Palazuelos, M., Brown, S. C., & Roberts, S. M. (2009). Characterization of Nanomaterials for Toxicological Evaluation. En *Nanotoxicity* (pp. 1-27). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470747803.ch1>

Priyam, A., Singh, P. P., & Gehlout, S. (2018). Role of Endocrine-Disrupting Engineered Nanomaterials in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00704>

Quirk, S. M., Cowan, R. G., & Harman, R. M. (2006). The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. *Journal of Endocrinology*, *189*(3), 441-453. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06549>

Rao, M. C., Midgley, A. R., & Richards, J. S. (1978). Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell*, *14*(1), 71-78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90302-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90302-1)

Rasmussen, L. M., Sen, N., Vera, J. C., Liu, X., & Craig, Z. R. (2017). Effects of in vitro exposure to dibutyl phthalate, mono-butyl phthalate, and acetyl tributyl citrate on ovarian antral follicle growth and viability†. *Biology of Reproduction*, *96*(5), 1105-1117. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144691>

Rueda-Romero, C., Hernández-Pérez, G., Ramos-Godínez, P., Vázquez-López, I., Quintana-Belmares, R. O., Huerta-García, E., Stepien, E., López-Marure, R., Montiel-Dávalos, A., & Alfaro-Moreno, E. (2016). Titanium dioxide nanoparticles induce the expression of early and late receptors for adhesion molecules on monocytes. *Particle and Fibre Toxicology*, *13*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0147-3>

Russell, D. L., Gilchrist, R. B., Brown, H. M., & Thompson, J. G. (2016). Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? *Theriogenology*, *86*(1), 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.019>

Sabir, S., Arshad, M., & Chaudhari, S. K. (2014). Zinc Oxide Nanoparticles for Revolutionizing Agriculture: Synthesis and Applications. *The Scientific World Journal*, *2014*, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/925494>

- Saceda, M., Lindsey, R. K., Solomon, H., Angeloni, S. V., & Martin, M. B. (1998). Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 66(3), 113-120. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(98\)00049-1](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(98)00049-1)
- Sahay, G., Alakhova, D. Y., & Kabanov, A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 145(3), 182-195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>
- Sharma, H. S., Hussain, S., Schlager, J., Ali, S. F., & Sharma, A. (2010). Influence of Nanoparticles on Blood–Brain Barrier Permeability and Brain Edema Formation in Rats. In Z. Czernicki, A. Baethmann, U. Ito, Y. Katayama, T. Kuroiwa, & D. Mendelow (Eds.), *Brain Edema XIV* (Vol. 106, pp. 359-364). Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-211-98811-4_65
- Shen, C., James, S. A., de Jonge, M. D., Turney, T. W., Wright, P. F. A., & Feltis, B. N. (2013). Relating Cytotoxicity, Zinc Ions, and Reactive Oxygen in ZnO Nanoparticle–Exposed Human Immune Cells. *Toxicological Sciences*, 136(1), 120-130. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft187>
- Srinivas, C. R., Lal, S., Thirumoorthy, M., Sundaram, S. V., & Karthick, P. S. (2006). Sunscreen application: Not less, not more. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 72(4), 306-307. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.26731>
- St Laurent, G., Shtokalo, D., Tackett, M. R., Yang, Z., Vyatkin, Y., Milos, P. M., Seilheimer, B., McCaffrey, T. A., & Kapranov, P. (2013). On the importance of small changes in RNA expression. *Methods (San Diego, Calif.)*, 63(1), 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.03.027>

Stelzer, R., & Hutz, R. J. (2009). Gold nanoparticles enter rat ovarian granulosa cells and subcellular organelles, and alter in-vitro estrogen accumulation. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(6), 685-690. <https://doi.org/10.1262/jrd.20241>

Stern, S. T., Adisheshaiah, P. P., & Crist, R. M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-20>

Stöckmann, D., Spannbrucker, T., Ale-Agha, N., Jakobs, P., Goy, C., Dyballa-Rukes, N., Hornstein, T., Kümper, A., Kraegeloh, A., Haendeler, J., & Unfried, K. (2018). Non-Canonical Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor by Carbon Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/nano8040267>

Tang, C. Y., & Yang, Z. (2017). Transmission Electron Microscopy (TEM). En *Membrane Characterization* (pp. 145-159). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5>

Tang, H.-Q., Xu, M., Rong, Q., Jin, R.-W., Liu, Q.-J., & Li, Y.-L. (2016). The effect of ZnO nanoparticles on liver function in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4275-4285. <https://doi.org/10.2147/IJN.S109031>

Tassinari, R., Cubadda, F., Moracci, G., Aureli, F., D'Amato, M., Valeri, M., De Berardis, B., Raggi, A., Mantovani, A., Passeri, D., Rossi, M., & Maranghi, F. (2014). Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: Focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology*, 8(6), 654-662. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.822114>

Taverne, Y. J. H. J., Bogers, A. J. J. C., Duncker, D. J., & Merkus, D. (2013). Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/862423>

Thurn, K. T., Arora, H., Paunesku, T., Wu, A., Brown, E. M. B., Doty, C., Kremer, J., & Woloschak, G. (2011). Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(2), 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.09.004>

Tiedemann, D., Taylor, U., Rehbock, C., Jakobi, J., Klein, S., Kues, W. A., Barcikowski, S., & Rath, D. (2014). Reprotoxicity of gold, silver, and gold–silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *The Analyst*, 139(5), 931-942. <https://doi.org/10.1039/C3AN01463K>

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335-344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>

US EPA National Center for Environmental Assessment, R. T. P. N. (s. f.). *Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide In Water Treatment And In Topical Sunscreen (Final)* [Reports & Assessments]. Recuperado 10 de enero de 2021, de <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=230972>

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>

Verma, A., & Stellacci, F. (2010). Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small*, 6(1), 12-21. <https://doi.org/10.1002/sml.200901158>

Wang, Z. L. (2004). Zinc oxide nanostructures: Growth, properties and applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16(25), R829-R858. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/16/25/R01>

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., & von Goetz, N. (2012). Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science & Technology*, 46(4), 2242-2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>

Westmeier, D., Stauber, R. H., & Docter, D. (2016). The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299, 53-57. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.008>

What It Is and How It Works | nano.gov. (s. f.). Recuperado 10 de enero de 2021, de <https://www.nano.gov/nanotech-101/what>

Wilson, C., & González-Billault, C. (2015). Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: Implications for neuronal development and trafficking. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00381>

Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2008). Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano*, 2(10), 2121-2134. <https://doi.org/10.1021/nn800511k>

- Xu, G., Lin, S., Law, W.-C., Roy, I., Lin, X., Mei, S., Ma, H., Chen, S., Niu, H., & Wang, X. (2012). The Invasion and Reproductive Toxicity of QDs-Transferrin Bioconjugates on Preantral Follicle *in vitro*. *Theranostics*, *2*(7), 734-745. <https://doi.org/10.7150/thno.4290>
- Xu, Q., Huff, L. P., Fujii, M., & Griendling, K. K. (2017). Redox regulation of the actin cytoskeleton and its role in the vascular system. *Free Radical Biology and Medicine*, *109*, 84-107. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.004>
- Yang, Z., Chen, J., Dou, R., Gao, X., Mao, C., & Wang, L. (2015). Assessment of the Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles on Two Crop Plants, Maize (*Zea mays* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(12), 15100-15109. <https://doi.org/10.3390/ijerph121214963>
- Yokoo, M., & Sato, E. (2004). Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *International Review of Cytology*, *235*, 251-291. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)35006-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)35006-0)
- Zhang, C., Zhai, S., Wu, L., Bai, Y., Jia, J., Zhang, Y., Zhang, B., & Yan, B. (2015). Induction of Size-Dependent Breakdown of Blood-Milk Barrier in Lactating Mice by TiO₂ Nanoparticles. *PLOS ONE*, *10*(4), e0122591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122591>
- Zhang, X., Li, W., & Yang, Z. (2015). Toxicology of nanosized titanium dioxide: An update. *Archives of Toxicology*, *89*(12), 2207-2217. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1594-6>
- Zhao, J., Liu, K., & Lin, X. (2013). Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors. *International Journal of Nanomedicine*, *2509*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S46919>

Zhao, X., Ze, Y., Gao, G., Sang, X., Li, B., Gui, S., Sheng, L., Sun, Q., Cheng, J., Cheng, Z., Hu, R., Wang, L., & Hong, F. (2013). Nanosized TiO₂-Induced Reproductive System Dysfunction and Its Mechanism in Female Mice. *PLoS ONE*, 8(4), e59378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059378>

Zhao, Y., Li, L., Zhang, P.-F., Shen, W., Liu, J., Yang, F.-F., Liu, H.-B., & Hao, Z.-H. (2015). Differential Regulation of Gene and Protein Expression by Zinc Oxide Nanoparticles in Hen's Ovarian Granulosa Cells: Specific Roles of Nanoparticles. *PLOS ONE*, 10(10), e0140499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140499>

Zook, J. M., MacCuspie, R. I., Locascio, L. E., Halter, M. D., & Elliott, J. T. (2011). Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 5(4), 517-530. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.536615>