



Universitat Autònoma de Barcelona

# **Efectos citogenéticos y génicos del Bisfenol A en ovocitos fetales humanos en cultivo.**

Memoria presentada por  
**Miguel Ángel Briño Enríquez**

Para optar al título de  
**Doctor en Biología Celular**

Tesis dirigida por  
**Dra. Montserrat Garcia Caldés**

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia  
Facultat de Medicina UAB

Directora

Doctorando

Dra. Montserrat Garcia Caldés

Miguel Ángel Briño Enríquez

Bellaterra, 27 de mayo del 2011



Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias al auspicio de:

Fondo de Investigación Sanitaria (Proyecto FIS 02/0297)

Universidad Autónoma de Barcelona (Proyecto PRP2006-02)

Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto BFU2006-1295)

Generalitat de Catalunya (2009 Proyecto SGR 1107)

Generalitat de Catalunya (Proyecto VALTEC 09-1-0007)

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (CONACyT SEP-2004-CO1-45910)

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (CONACyT 166825)

Agencia Española de Cooperación Internacional (Beca MAE/AECI 2008/09 0000287752)



A mis padres



“For the first time in the history of the world, every human being is now subjected to contact with dangerous chemical from the moment of conception until death”

“Imagine a world where both livestock and wild animals become weak, sicken and then die; where insects do not roam, pollination cannot occur effectively, and so there are no fruits; where silence falls across the land because there are no birds left to sing”

The silent spring; Rachel Carson, 1962.





“La ilusión es el motor de la vida”

MAIR & MABE

“Uno no es de donde nace, si no de donde mejor la pase”

Dicho popular Mexicano



<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. GAMETOGÉNESIS	1
1.1.2. OVOGÉNESIS	1
1.1.3. MEIOSIS	5
1.1.3.1. ETAPAS DE LA MEIOSIS	5
1.1.3.2. APAREAMIENTO Y SINAPSIS	10
1.1.3.3. RECOMBINACIÓN MEIÓTICA	11
1.1.3.4. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA MEIOSIS	12
1.2. CULTIVO DE OVOCITOS FETALES	22
1.2.1. FACTORES DE CRECIMIENTO Y HORMONAS	23
1.2.3. MODELOS DE CULTIVO	25
1.3. DISRUPTORES HORMONALES	27
1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS DISRUPTORES HORMONALES	27
1.3.2. BISFENOL A (BPA)	27
1.3.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL BPA	29
1.3.4. RUTAS DE EXPOSICIÓN	29
1.3.5. NIVELES DE BPA EN FLUIDOS Y TEJIDOS HUMANOS	31
1.3.6. METABOLISMO DEL BPA	33
1.3.7. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL BPA	35
1.3.8. EFECTOS DEL BPA EN HUMANOS	37
1.3.9. EFECTOS REPRODUCTIVOS	38
1.3.10. EFECTOS DEL BPA EN LA PRIMERA PROFASE MEIÓTICA	39
<b>2. OBJETIVOS</b>	41
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	43
3.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	43
3.1.2. CASOS EMPLEADOS	43
3.1.3. MANEJO INICIAL DEL MATERIAL Y TRANSPORTE DEL TEJIDO	44
3.1.4. MÉTODOS DE DISGREGACIÓN EMPLEADOS	45
3.1.5. MÉTODOS DE SIEMBRA	47
3.1.6. MEDIOS DE CULTIVO	48
3.1.7. PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL CULTIVO	49
3.1.8. TIEMPOS DE ANÁLISIS	50
3.1.9. EXTENSIÓN Y FIJACIÓN DE OVOCITOS	50
3.1.10. INMUNOTINCIÓN	51
3.1.11. MICROSCOPÍA	53
3.1.12. TIPO DE ESTUDIO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
3.2.1. CULTIVO DE OVOCITOS FETALES HUMANOS EN PRESENCIA DE BPA	55
3.2.2. MEDIOS DE CULTIVO	56
3.2.3. METODOLOGÍA DE CULTIVO PARA OVOCITOS EXPUESTOS A BPA	57
3.2.4. EXTRACCIÓN Y EXTENSIÓN DEL CULTIVO, INMUNOTINCIÓN, ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y ESTADÍSTICO	57
3.2.5. HIBRIDACIÓN IN SITU ACOPLADA A FLUORESCENCIA (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION, FISH) SOBRE PORTAOBJETOS PREPROCESADOS CON INMUNOTINCIÓN	57
3.3.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE OVOCITOS DE OVOCITOS	59
3.3.2. RETROTRANSCRIPCIÓN	61
3.3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL	62
3.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1.1. RESULTADOS DEL PRIMER OBJETIVO ESPECÍFICO	65
4.1.2. RESULTADOS DEL SEGUNDO OBJETIVO ESPECÍFICO	95
4.1.3. RESULTADOS DEL TERCER OBJETIVO ESPECÍFICO	141

<b>5. DISCUSIÓN</b>	
5.1 DESARROLLO DE UN MODELO <i>IN VITRO</i> QUE PERMITE EL CULTIVO DE OVOCITOS FETALES HUMANOS	171
5.2 EFECTOS DEL BPA EN OVOCITOS FETALES HUMANOS EN CULTIVO	176
5.3 POSIBLES IMPLICACIONES DE LOS EFECTOS DEL BPA A LARGO PLAZO	181
5.4.1 VENTAJAS DEL MODELO	181
5.4.2 DESVENTAJAS DEL MODELO	182
<b>6. CONCLUSIONES</b>	185
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	187

**Abreviaturas**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	( <i>Ataxia-telangiectasia mutated serine/threonine protein kinase</i> ) Proteína quinasa mutada (serina/treonina) de ataxia telangiectasia
ATR	( <i>Ataxia-telangiectasia mutated serine/threonine protein kinase and Rad3-related protein</i> ) Proteína quinasa mutada (serina/treonina) de ataxia telangiectasia relacionada con Rad3
BLM	( <i>Bloom's Syndrome protein</i> ) Proteína del Síndrome de Bloom
BRCA1/BRCA2	( <i>Breast cancer susceptibility proteins 1 and 2</i> ) Proteínas de susceptibilidad a cáncer de mama 1 y 2
BRCT	( <i>C-terminal domain of a breast cancer susceptibility protein</i> ) Dominio carboxilo terminal de la proteína de susceptibilidad a cáncer de mama
CO	( <i>Crossover</i> ) Entrecruzamientos
Cp/Ct	(Crossing point/Cycle threshold) Punto de cruce/Umbral del Ciclo
DES	( <i>Diethylstilboestrol</i> ) Dietil-estil-bestrol
DMC1	( <i>Disrupted meiotic cDNA1 protein</i> ) Proteína de disrupción meiótica cDNA1
DMEM	( <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> ) Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DSB	( <i>Double-strand breaks</i> ) Ruptura de doble cadena de ADN
E <sub>2</sub>	Estradiol
EFSA	( <i>European Food Safety Authority</i> ) Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EPA	( <i>US Environmental Protection Agency</i> ) Agencia de protección del medio ambiente de los Estados Unidos
ERRs	( <i>Estrogen related receptors</i> ) Receptores relacionados con estrógeno
EU	( <i>European Union</i> ) Unión Europea
FCS	( <i>Fetal calf serum</i> ) Suero bovino fetal
FISH	( <i>Fluorescent in situ hybridization</i> ) Hibridación <i>in situ</i> asociada a fluorescencia
FSH	( <i>Follicle stimulating hormone</i> ) Hormona folículo estimulante
GLUT	( <i>Glucose transporter type</i> ) Transportadores de glucosa de tipo GLUT

GnRH	( <i>Gonadotropin relasing hormone</i> ) Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)
GPR30	( <i>G protein-coupled receptor 30</i> ) Receptor 30 acoplado a proteínas G
IF	Inmunofluorescencia (inmunotinción)
ILGF	( <i>Insulin-like growth factor</i> ) Factor de crecimiento parecido a la insulina
LH	( <i>Luteinizing hormone</i> ) Hormona luteinizante
LIF	( <i>Leukaemia inhibitory factor</i> ) Factor inhibidor de la leucemia
MAPK	( <i>Mitogen actived protein kinases</i> ) Proteínas quinasas activadas por mitogénos
MAPKK	( <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> ) Proteína quinasa-quinasa activada por mitógeno
αMEM	( <i>Minimal essential medium alpha</i> ) Medio de cultivo esencial mínimo tipo alfa
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MLH1	( <i>DNA mismatch repair protein Mlh1/MutL. Protein 1</i> ) Proteína de reparación de DNA
MLH3	( <i>DNA mismatch repair protein Mlh1/MutL protein 3</i> ) Proteína de reparación de DNA 3
MMR	( <i>Mismatch repair proteins</i> ) Proteínas de reparación de discordancias de DNA
NCO	( <i>Non-crossover</i> ) Sin entre-cruzamientos
NIEHS	( <i>National Institute of Environmental Sciences, USA</i> ) Instituto Norteamericano de Ciencias Ambientales
PCR	( <i>Polymerase chain reaction</i> ) Reacción en cadena de la polimerasa
PGC	( <i>Primordial germinal cells</i> ) Células primordiales germinales
RAD21	( <i>Double-strand-break repair protein rad21 homolog</i> ) Proteína de reparación de rupturas de doble cadena rad21
RAD51	( <i>Radiation 51 sensible protein</i> ) Proteína sensible a radiación 51
RAD51C	( <i>Radiation 51 protein sensible C</i> ) Proteína sensible a radiación 51C
RPA	( <i>Replication protein A</i> ) Proteína de replicación A
RT-PCR	( <i>Real time polymerase chain reaction</i> ) Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SCF	<i>(Stem cell factor)</i> Factor de crecimiento de células madre o troncales
SDG	Semanas de gestación
SMC	<i>(Structural maintenance of chromosomes proteins)</i> Proteínas de mantenimiento de la estructura de los cromosomas
SPO11	<i>(Meiotic protein covalently bound to DSB homolog)</i> Proteína meiótica de unión covalente a rupturas de doble cadena homólogas
STAG1/STAG2	<i>(Stromal antigen 1/ stromal antigen 2)</i> Antígeno estrómico 1 y 2
SYCP1	<i>(Synaptonemal complex protein 1)</i> Proteína del complejo sinaptonémico 1
SYCP2	<i>(Synaptonemal complex protein 2)</i> Proteína del complejo sinaptonémico 2
SYCP3	<i>(Synaptonemal complex protein 3)</i> Proteína del complejo sinaptonémico 3
T3	tri-iodo-tironina
TGF- $\beta$ 2	<i>(Transforming growth factor-<math>\beta</math>2)</i> Factor de crecimiento transformante beta
XRCC3	<i>(X-ray repair cross-complementing protein 3)</i> Proteína de reparación de complementariedad cruzada de rayos X 3
$\gamma$ H2AX	<i>(2AX histone gamma)</i> Histona gama 2AX





## 1. Introducción



### **1.1. GAMETOGÉNESIS.**

La gametogénesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de las células germinales hasta convertirse en gametos haploides aptos para la fecundación. La gametogénesis es un proceso que implica una serie de eventos entre los cuales se encuentra la meiosis. La meiosis se define como un tipo de división celular mediante el cual el número de cromosomas se reduce a la mitad debido a la existencia de una única ronda de replicación del material genético seguida de dos rondas consecutivas de segregación cromosómica. Las dos segregaciones consecutivas permitirán asegurar la presencia de una dotación haploide del material genético en todas las células formadas (gametos) así como la introducción de la variabilidad genética.

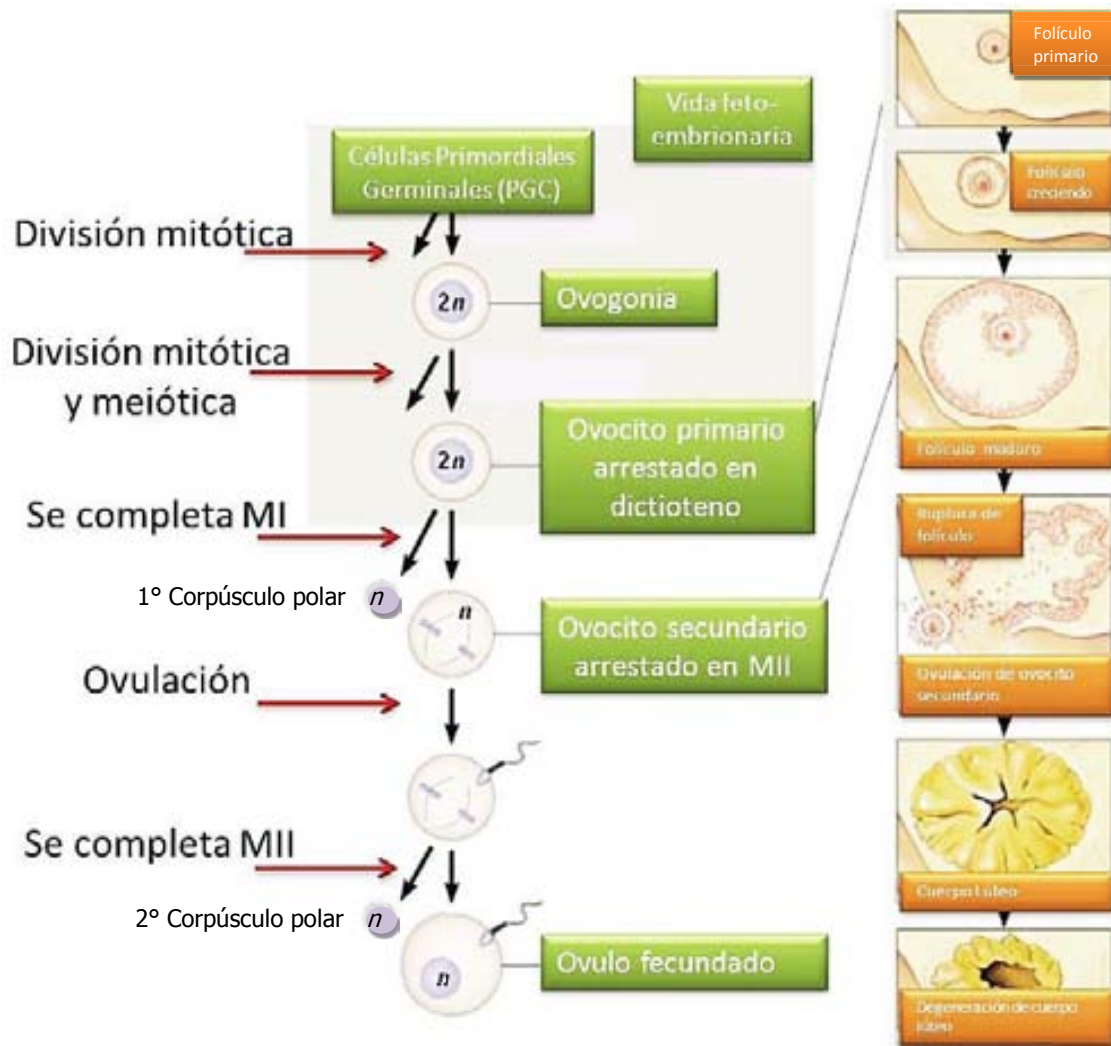
En el ser humano, la gametogénesis comienza alrededor de la tercera semana de desarrollo embrionario con la formación de las células germinales primordiales (también llamadas germinativas primordiales). En mamíferos entre ellos el humano, las células germinales primordiales tienen como origen el epiblasto. Células provenientes del epiblasto se diferencian en endodermo y una vez diferenciadas en células endodérmicas, un número reducido de ellas atraviesan la región caudal de la estría primitiva embrionaria y dan origen a las células germinales primordiales. Posteriormente, las células germinales primordiales se sitúan en el saco vitelino cerca de la alantoides. Durante la quinta y sexta semana de desarrollo embrionario, mediante el estímulo de factores quimiotácticos y fenómenos mecánicos las células germinales primordiales migran a las crestas genitales.

Inicialmente, las células germinales primordiales se multiplican mediante divisiones mitóticas hasta que entre la semana 7ª y 10ª, comienzan su diferenciación. De forma clásica se considera que a partir de estas semanas de gestación el proceso de diferenciación de las células germinales primordiales a ovogonias y posteriormente a ovocitos es irreversible (Jewgenow et al., 1998). Entre las semanas 10ª y 13ª, se pueden observar los primeros ovocitos.

Actualmente se considera que estos fenómenos no son excluyentes, es decir que mientras algunas células germinales primordiales continúan dividiéndose mitóticamente otras han iniciado su diferenciación a ovogonias y algunas de éstas hacia ovocitos (Figura 1.1.).

#### **1.1.2. OVOGÉNESIS.**

La obtención de los gametos femeninos es un proceso largo que comienza durante la vida fetal y que solo concluye cuando el óvulo es fecundado. Con el objetivo de hacer más claros los conceptos y entender los diferentes eventos que suceden durante la ovogénesis, dicho proceso se explica de acuerdo a su evolución en el tiempo. De esta manera, la ovogénesis se divide en etapa prenatal y etapa postnatal. A continuación se describen los eventos más importantes que suceden en cada una de estas etapas.

**Figura 1.1.** Diferentes estadios de la gametogénesis femenina humana.

MI: primera metafase meiótica

MII: segunda metafase meiótica

$2n$ : contenido cromosómico diploide

$n$ : ovocito con un contenido cromosómico haploide

Imagen traducida y modificada de la base de imágenes de EMBO. [www.EMBO.org](http://www.EMBO.org)

### Etapa prenatal

Durante la etapa prenatal, tal y como se mencionó (apartado 1.1) las células germinales primordiales se multiplican mitóticamente, se diferencian a ovogonias y posteriormente a ovocitos. El número de ovogonias y ovocitos durante la etapa prenatal está condicionado por la edad gestacional, el grado de diferenciación y la presencia de factores de crecimiento (Miyano et al., 2004). En este sentido, durante el período comprendido entre las semanas 10ª y 13ª la población celular es de  $6 \times 10^5$  células y alcanza el valor máximo de  $6.8 \times 10^6$  ovocitos durante las semanas 20ª y 24ª de la gestación. Al final del período fetal es posible observar un gran número de células en degeneración (ovocitos atrésicos). De esta manera, al nacimiento solo, aproximadamente,  $2 \times 10^6$  de

ovocitos serán viables. Número que disminuirá a lo largo de la vida hasta alcanzar un número de  $3 \times 10^5$  ovocitos (Baker, 1963) durante la pubertad y de los cuales solo, aproximadamente, unos 400 se ovularán.

Alrededor de la semana 22<sup>a</sup> se observan los primeros folículos primordiales, los cuales están formados por un ovocito I en fase de dictioteno rodeado por una capa de células foliculares planas no diferenciadas que posteriormente se diferencian en células de la granulosa y células de la teca (Eppig and O'Brian, 1996; Eppig et al., 1996).

A partir del sexto mes de gestación la posibilidad de observar células primordiales germinales así como ovogonias en el ovario fetal, se vuelve prácticamente nula ya que el proceso de diferenciación se ha llevado a cabo casi por completo. Es así como durante el período fetal se comienza la gametogénesis femenina alcanzando el final de la primera profase meiótica y determinando el número total de células germinales que la mujer tendrá durante su vida reproductiva (Senbon et al., 2003; Ota et al., 2003).

Actualmente, la existencia de células germinales primordiales y ovogonias activas en ovarios de hembras de ratón adultas se encuentra en debate, pero se considera que la presencia de dichas células podría contrarrestar, en la vida adulta, el fenómeno de atrésia celular que sucede en el período fetal, infancia y pubertad (Johnson et al., 2004, 2008; Greenfeld and Flaws, 2004; Spradling et al., 2004).

### **Etapas postnatal**

Después del nacimiento, la gametogénesis femenina continúa, los folículos primordiales evolucionan a folículos primarios y éstos posteriormente, se transformarán en secundarios. Este fenómeno es orquestado esencialmente por el comportamiento y crecimiento de las células de la granulosa. Es de suma importancia indicar que, estos eventos son independientes de la estimulación gonadotrópica (Parrott and Skinner, 1999).

Al establecerse el folículo primario en la vida postnatal, se forma una membrana acelular denominada zona pelúcida que se localiza entre el ovocito y las células foliculares. Antes de la pubertad, las células foliculares también llamadas células de la granulosa están delimitadas por una membrana basal; por fuera de este tejido está el tejido conjuntivo del ovario que forma una cubierta a los folículos denominada teca folicular y se subdivide en teca interna y teca externa.

La maduración folicular hormonal se inicia durante la pubertad con crecimiento simultáneo de hasta 10 folículos primarios (también llamados pre-antrales) debido a la estimulación hormonal de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que permite la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) por la adenohipófisis. Durante esta etapa, las células de la granulosa que cuentan con receptores de membrana para FSH, inician la maduración folicular dirigida por hormonas.

Como respuesta al estímulo hormonal las células de la granulosa proliferan y sintetizan activina que incrementa la tasa de proliferación. Como efecto de esta proliferación y estimulación se producen estrógenos, los cuales incrementan su concentración de manera paulatina debido a la acción de la aromatasas propia de las células de la teca que produce  $17\beta$  estradiol. Esta hormona y el trasudado de los vasos forman el líquido folicular que es depositado en los espacios existentes entre las células foliculares, las cuales confluyen y forman una cavidad, denominada antro folicular y que es propia del folículo secundario. El trasudado que se encuentra en el antro además de contener estrógenos contiene FSH, LH, proteínas y proteoglicanos. Los proteoglicanos debido a su estructura química hidrofílica retienen una gran cantidad de agua que contribuye al crecimiento rápido del folículo. Al crecer, el folículo se acerca a la superficie del ovario y aumenta la proliferación del cúmulo oóforo (conjunto de células de la granulosa en contacto directo con el ovocito después de la formación del antro) hasta que el folículo alcanza un diámetro de 8mm que durante esta etapa de crecimiento se le denomina folículo terciario de von Graaf (revisión de Cabero and Suarez, 2007).

Al inicio de la fase de maduración, el núcleo del ovocito primario se encuentra como vesícula germinal (ovocito bloqueado en dictioteno). En respuesta a la elevación pre-ovulatoria de la hormona luteinizante (pico de LH), el ovocito primario del folículo dominante reinicia el proceso de división meiótica (Campbell et al., 1994; Carolan et al., 1994; Lonergan et al., 1994; revisión de Cabero and Suarez, 2007). El núcleo del ovocito entra en diacinesis, y al final de la profase I se disgrega la envoltura nuclear y ocurre la ruptura de la vesícula germinal. Al mismo tiempo se produce una polimerización de los microtúbulos, desaparecen los nucléolos y los cromosomas se condensan y se orientan formando el huso acromático correspondiente a la metafase I. La reactivación de la meiosis en el ovocito se inicia aproximadamente 12 horas antes de la ovulación, esta reactivación se caracteriza por la finalización de la primera división meiótica originando un ovocito secundario con 23 bivalentes (ovocito en metafase I, MI). Los cromosomas que se segregan se sitúan entre la zona pelúcida y la membrana plasmática en una estructura celular denominada primer corpúsculo polar.

De los, aproximadamente, 10 folículos que inician la maduración folicular por ciclo, uno de ellos, el denominado folículo dominante (descrito como aquel con un crecimiento mayor que los otros que inician la maduración) se independiza del control hormonal de FSH. Una vez independizado, dicho folículo produce cantidades elevadas de inhibina y bloquea la secreción hipofisiaria de FSH y sus niveles circulantes en sangre disminuyen. La disminución de los niveles circulantes de FSH conlleva a la atrofia del resto de los folículos que iniciaron su maduración por la depleción del efecto hormonal (revisión de Cabero and Suarez, 2007).

Veinticuatro horas antes de la ovulación la hipófisis secreta un pico de FSH y LH, lo que permite que se ovule un ovocito rodeado de células foliculares. Este ovocito que inició su segunda

división meiótica detiene nuevamente el proceso en la segunda metafase meiótica (MII). Dicha división solo concluye si la célula es fecundada (Senbon et al., 2003).

### **1.1.3. MEIOSIS.**

La meiosis se define como un tipo de división celular mediante el cual el número de cromosomas se reduce a la mitad debido a la existencia de una única ronda de replicación del material genético seguida de dos rondas consecutivas de segregación cromosómica. De las dos divisiones destaca la primera que es en la que se lleva a cabo la reducción del genoma. Al final de la primera división, se obtienen dos células haploides, dado que se produce la separación de cromosomas homólogos. La segunda división en cambio es análoga a una mitosis en la que se separan las cromátides hermanas.

Este proceso se encuentra altamente conservado en la evolución, ya que se presenta en todos los organismos que se reproducen sexualmente. La variación de los procesos meióticos entre las diferentes especies es un hecho, sin embargo existen ciertos fenómenos comunes a la mayoría de las mismas. A continuación se mencionan los procesos comunes que ponen de manifiesto la importancia de la meiosis (Champion and Hawley, 2002; revisión de Garcia-Caldés and Roig, 2007):

- Apareamiento y sinapsis entre cromosomas homólogos. Los cromosomas homólogos entran en contacto físico entre ellos gracias a la estructura proteica del complejo sinaptonémico.
- Intercambio de material genético entre cromosomas homólogos mediante el proceso de recombinación. Este proceso permite la variabilidad genética de la especie. Por otro lado, desde el punto de vista estructural, el intercambio de material entre los cromosomas permite que se mantengan unidos físicamente en forma de bivalentes, lo que facilita su segregación durante la primera división meiótica.
- Segregación de cromosomas homólogos. A diferencia de lo que ocurre en la metafase mitótica, durante la meiosis los dos centrómeros de cada cromosoma del bivalente se dirigen al mismo polo del huso meiótico. Este evento permite la separación de los cromosomas homólogos en la primera división meiótica generando de este modo dos células haploides. Posteriormente, los cinetocoros de los cromosomas se reorientan, siguiendo un proceso de división similar al mitótico. De esta manera, logran la segregación de las cromátides hermanas.

#### **1.1.3.1. ETAPAS DE LA MEIOSIS.**

Tal y como se ha mencionado en el apartado previo (1.1.3.), la meiosis es un tipo de división celular especializado en la cual el número de cromosomas se reduce a la mitad debido a la existencia de una única ronda de replicación del material genético seguida de dos rondas

consecutivas de segregación de cromosomas. Con el objetivo de describir todos los procesos que suceden durante la meiosis, la meiosis se divide en primera división meiótica y segunda división meiótica (Figura 1.2.).

### **Primera división meiótica**

Sin duda esta es la división más especializada de las dos que suceden durante la meiosis. Durante esta primera división tienen lugar los procesos de apareamiento, sinapsis, recombinación y segregación de cromosomas homólogos. Al final de esta primera división se obtienen gametos haploides, es decir 23 cromosomas cada uno de ellos con dos cromátidas hermanas.

Esta primera división consta de 4 fases: profase, metafase, anafase y telofase. Las fases mencionadas se describen de manera breve a continuación:

#### **Profase I:**

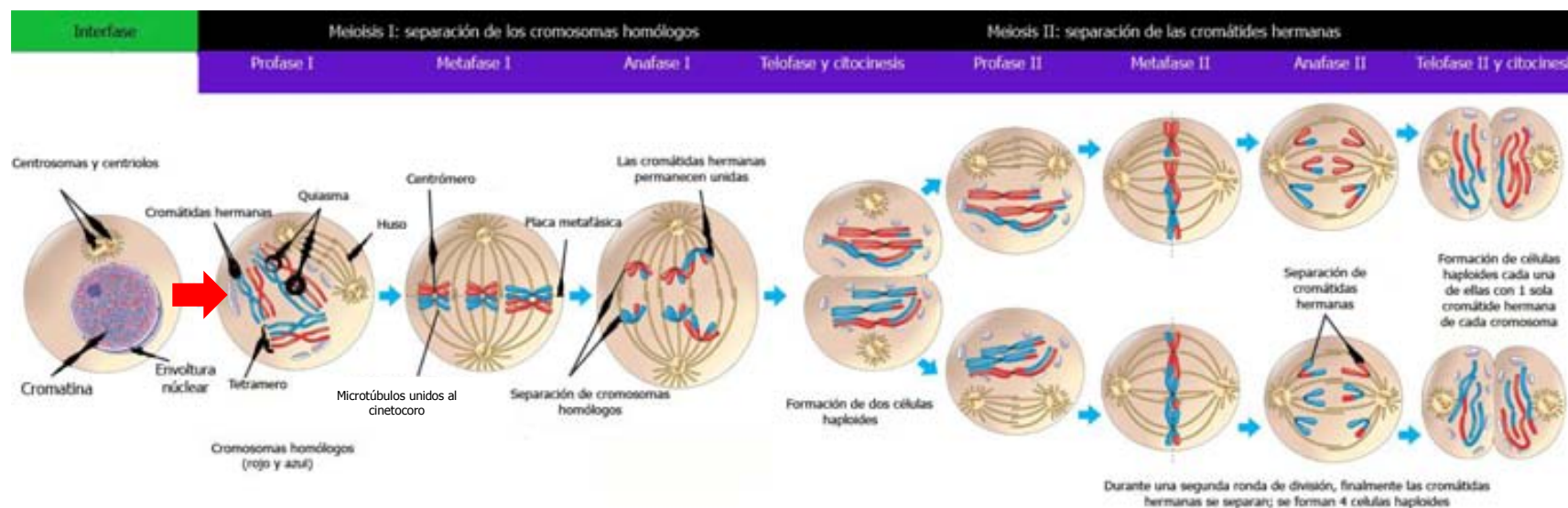
La profase de la primera división meiótica es un estadio muy especializado de la meiosis y que sin duda es la que mayor duración tiene dentro del proceso de división meiótica. En el caso específico de la mujer, este proceso puede ser extremadamente prolongado ya que los ovocitos pueden permanecer en dictioteno durante décadas. Durante la profase I, los cromosomas homólogos se aparean, sinapsan y recombinan.

De manera clásica, esta fase se ha subdividido en sub-etapas o sub-estadios en base a las características morfológicas de los cromosomas. Las sub-etapas o sub-estadios de la primera profase meiótica son: pre-leptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. A continuación y de manera breve se describen los eventos que suceden en cada una de ellas (Figura 1.3).

- Pre-leptoteno: durante este estadio comienza la compactación cromosómica, dicha compactación es debida a que las secuencias de ADN repetitivo alfa situadas en los centrómeros se modifican permitiendo que los cromosomas se reubiquen (Scherthan and Schonborn, 2001; Scherthan, 2006; Scherthan, 1996).
- Leptoteno: durante este estadio los cromosomas homólogos comienzan a individualizarse es decir, a pasar de un núcleo interfásico compacto donde los cromosomas son indistinguibles a un núcleo donde es posible localizar los cromosomas como finas hebras que producen una imagen de ovillo de lana. En este estadio los cromosomas son largos y delgados, pero a medida que esta fase progresa se compactan y acortan. Cada cromosoma está unido por sus dos extremos a la envoltura nuclear por medio de una estructura especializada denominada placa de unión. La imagen producida por los cromosomas unidos mediante la acumulación de telómeros a la placa de unión es visible durante la transición del leptoteno al zigoteno y recibe el nombre de *bouquet* o ramo (Scherthan and Schonborn, 2001).



**Figura 1.2.** Esquema general de la meiosis. Diagrama de primera división meiótica y segunda división



➡ Indica el paso esquemático de un núcleo en interfase a la representación esquemática del núcleo en las fases de la meiosis.

Imagen traducida y modificada de Pearson Education, Inc; 2005.

- Es importante señalar que aun cuando cada cromosoma se ha replicado y está formado por dos cromátides hermanas, éstas se encuentran en estrecha aposición por lo que se observan como un cromosoma simple (las cromátides hermanas no serán visibles de manera individual hasta el final de la profase en las etapas de diploteno y diacinesis). Durante el leptoteno, también se inicia el proceso de recombinación (el proceso de recombinación se explica en el apartado 1.1.3.3.).
- Zigoteno: durante este estadio se produce el apareamiento y la sinapsis de los cromosomas homólogos (el proceso de apareamiento y sinapsis se explica en el apartado 1.1.3.2.). En general, la sinapsis comienza cuando los extremos de los cromosomas homólogos se unen a nivel de la envoltura nuclear y esta unión continúa hacia el interior a modo de cremallera a partir de ambos extremos, alineándose lateralmente. En otros casos, la sinapsis puede empezar en las regiones internas de los cromosomas y avanzar hacia los extremos produciendo el mismo tipo de alineación (Fawcett, 1956; revisión de Garcia-Caldés and Roig, 2007).
- Paquiteno: durante este estadio los cromosomas homólogos están completamente sinapsados es decir están unidos por medio del complejo sinaptonemal y forman los bivalentes. En este estadio la sinapsis se ha completado en todos los cromosomas y se observan los nódulos de recombinación intercalados a lo largo de los cromosomas. Los nódulos de recombinación median los intercambios cromosómicos que darán lugar a entrecruzamientos entre cromátides no hermanas (Hunt and Hassold 2002; Lynn et al., 2004).
- Diploteno: durante este estadio los cromosomas homólogos se desinapsan, es decir se separan el uno del otro. Sin embargo, cada bivalente permanece unido mediante uno o varios quiasmas, los quiasmas representan los puntos en los cuales se produjo la recombinación o entrecruzamiento. En los ovocitos este estadio tiene una duración de años, incluso décadas. El ovocito al entrar en este estado de bloqueo específico, se le llama ovocito en dictioteno y es durante este estadio que se producen diversos procesos, entre ellos la síntesis de materiales de reserva del óvulo (síntesis de ARN).
- Diacinesis: durante este estadio, cesa la síntesis de ARN y los cromosomas se condensan, aumentando su grosor y se separan totalmente de la envoltura nuclear. De manera simultánea se observa claramente que cada bivalente está formado por cuatro cromátides hermanas unidas por sus centrómeros, mientras que las cromátides no hermanas que han recombinado están unidas mediante quiasmas. Finalmente es importante señalar que el estadio de diacinesis es una etapa de transición hacia metafase I (Lynn et al., 2004).

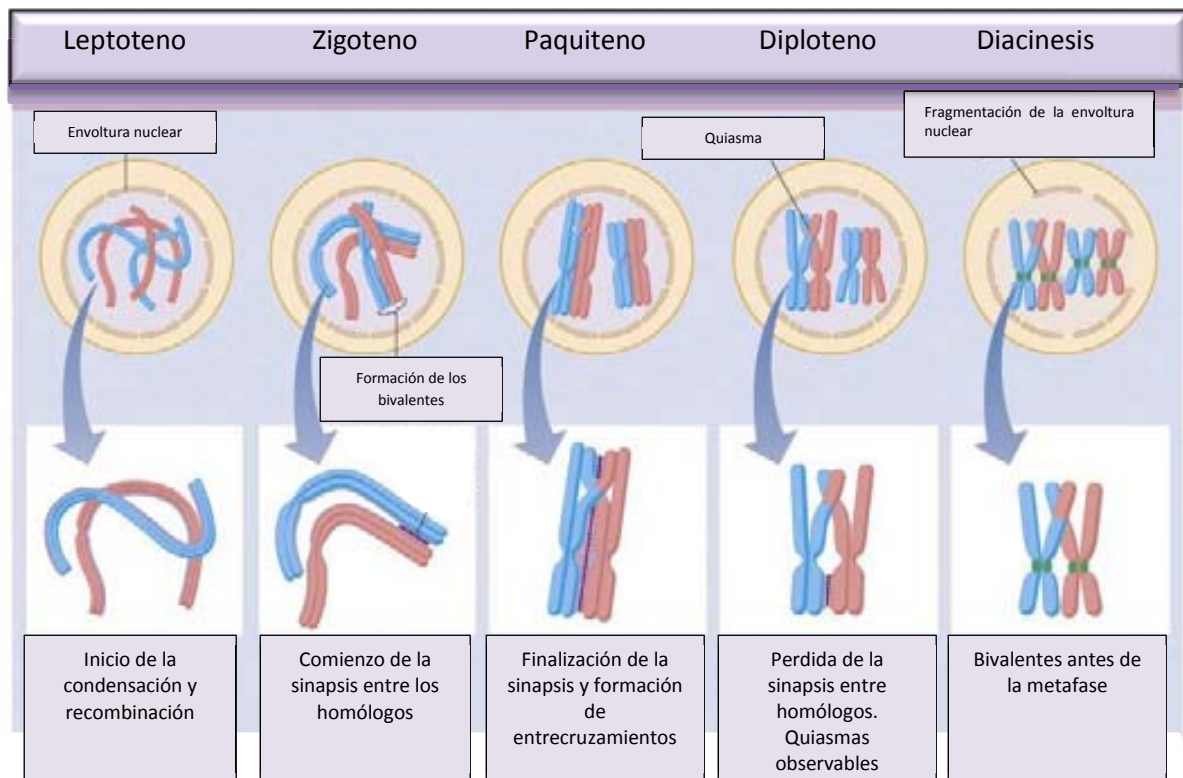
**Figura 1.3.** Esquema de los diferentes sub-estadios de la primera profase meiótica.

Imagen traducida y modificada de Pearsons Education Inc., 2009.

#### Metafase I:

Durante esta fase la envoltura nuclear desaparece y los bivalentes se disponen en la placa metafásica. Cada cromosoma tiene sus cinetócoros unidos a las fibras del huso acromático. Los cinetócoros de las cromátidas hermanas se orientan al mismo polo, mientras que el de los cromosomas homólogos se orientan a polos opuestos.

#### Anafase I:

Durante esta fase, la cohesión existente entre los cromosomas homólogos se pierde, lo que permite que se separen y se coloque cada uno de ellos en un polo diferente. La separación de los homólogos permite la resolución de los quiasmas generados durante la profase I.

#### Telofase I:

Durante esta fase con cada uno de los cromosomas homólogos en un polo diferente de la célula se produce la división celular, esta división genera dos células hermanas. Las dos células generadas contienen 23 cromosomas (univalentes), por lo que se considera una célula haploide. Los 23 cromosomas que se encuentran en cada una de las dos células hermanas, está formado por dos cromátidas hermanas. Es importante señalar, que en hembras de mamíferos, estas divisiones no son simétricas, es decir una de las células hermanas obtenida recibe la mayor parte del citoplasma de la célula inicial (ovocito), lo que le permite proseguir el proceso meiótico. Por otro

lado, la célula hermana que recibe la menor cantidad de citoplasma en general degenera rápidamente pero en ocasiones se puede llegar a dividir. Esta célula hermana que degenera se le llama primer corpúsculo polar.

### **Segunda división meiótica**

De las dos divisiones celulares que constituyen la meiosis, la segunda división es la menos especializada. Esta segunda división mimetiza los eventos mitóticos excepto por que la carga cromosómica inicial a diferencia de la mitosis donde es diploide (46 cromosomas,  $2n$ ) es haploide (23 cromosomas,  $n$ ).

Esta segunda división meiótica consta de 4 fases, profase II, metafase II, anafase II y telofase II. Las fases mencionadas se describen de manera breve a continuación:

Profase II:

Durante esta fase, se forma el nuevo huso meiótico y se rompe la envoltura nuclear. Es importante señalar que esta fase, en general es muy rápida, y en hembra humana se considera inexistente.

Metafase II:

Durante esta fase los univalentes (cada uno de los 23 cromosomas con sus dos cromátides hermanas) se alinean en la placa metafásica y en cada cromátide hermana se forma un grupo de fibras cinetocóricas que se extienden en direcciones opuestas a partir del centrómero. Durante toda esta fase las cromátides hermanas se mantienen unidas mediante el centrómero.

Anafase II:

Durante esta fase la unión entre las cromátides hermanas se pierde mediante la brusca separación de los cinetocoros y cada una de ellas se dirige a un polo.

Telofase II:

Durante esta fase se forman las envolturas nucleares de las nuevas células. Al igual que en la primera división meiótica, la división asimétrica de la célula conlleva a la obtención de dos células, una de las cuales conserva la mayor parte del citoplasma, mientras que la otra tiene poco volumen citoplasmático (segundo corpúsculo polar). Las nuevas células obtenidas presentan una sola cromátide hermana.

#### **1.1.3.2. APAREAMIENTO Y SINAPSIS.**

Al final de la fase S meiótica, las cromátides hermanas se unen mediante la interacción de un complejo proteico denominado complejo de cohesinas (las características de las cohesinas se describen en el apartado 1.1.3.4.).

El apareamiento entre los cromosomas homólogos tiene su inicio durante el leptoteno mediante una serie de pasos en los cuales los cromosomas maternos y paternos se sitúan en

parejas homólogas, lo que permite la interacción entre ambos cromosomas. La proximidad entre los cromosomas permite el reconocimiento de secuencias homólogas entre ambos, lo que facilita su interacción.

En el estadio de leptoteno las proteínas SYCP2 (*synaptonemal complex protein 2*) y SYCP3 (*synaptonemal complex protein 3*) propias del elemento lateral del complejo sinaptonémico se unen a las cohesinas que mantienen unidas las cromátides hermanas (Lammers et al., 1994; Offenberget al., 1998). Las estructuras formadas por el complejo de cohesinas y las proteínas del elemento lateral del complejo sinaptonémico se denominan elementos axiales (Prieto et al., 2004).

La sinapsis se inicia en el estadio de zigoteno y consiste en la unión física de los cromosomas homólogos previamente apareados. La unión de los homólogos se realiza cuando los elementos axiales quedan unidos por medio de los filamentos transversales que se encuentran principalmente constituidos por la proteína SYCP1 (*synaptonemal complex protein 1*) del complejo sinaptonémico (Kolas and Cohen, 2004; Kolas et al., 2004).

La sinapsis que se inició en zigoteno finaliza durante el paquíteno. En paquíteno todos los cromosomas homólogos se encuentran totalmente apareados y sinapsados. Una particularidad de la sinapsis en ovocitos humanos es que aunque fundamentalmente se inicia en regiones subteloméricas, existen trabajos que indican que la sinapsis también se inicia en las zonas intersticiales de los brazos cromosómicos (García et al., 1987; Bojko, 1988).

Finalmente durante el diploteno se inicia el proceso en el cual los cromosomas homólogos se separan, perdiendo la sinapsis. El proceso se acompaña de la pérdida de las estructuras proteicas propias del complejo sinaptonémico. De esta manera al final de la primera profase meiótica los cromosomas homólogos se mantienen unidos por medio de los puntos en donde se ha producido la recombinación.

### **1.1.3.3. RECOMBINACIÓN MEIÓTICA.**

La recombinación meiótica entre los cromosomas homólogos se inicia en leptoteno con la formación de las rupturas de doble cadena (DSB) (de sus siglas en inglés *double-strand breaks*). Las rupturas de doble cadena se producen por la acción de una proteína con función de transesterasa llamada SPO11 (*meiotic protein covalently bound to DSB homolog*) (Keeney, 2001; Mahadevaiah et al., 2001; Keeney and Neal, 2006). Posteriormente, las zonas en las cuales se produjeron las rupturas de doble cadena se fosforila la proteína H2AX (*histone 2AX*), una vez que ha sido fosforilada adquiere el nombre de  $\gamma$ H2AX y tiene la función de señalar los sitios en los cuales se produjo la ruptura de doble cadena (Mahadevaiah et al., 2001; Tang et al., 2010). Una vez señalizados los sitios en los cuales se realizaron las rupturas de doble cadena una serie de proteínas actúan sobre ellas modificando los extremos de ADN cortado preparándolos para la interacción con la cromátide homóloga.

Durante zigoteno las proteínas implicadas en el proceso de recombinación (apartado 1.1.3.4.) inician la reparación de las rupturas de doble cadena mediante la recombinación homóloga. La recombinación homóloga implica la formación de uniones dobles entre los cromosomas homólogos, dichas uniones dobles reciben el nombre de *double Holliday junction* (Svetlanov and Cohen, 2004). Estas uniones se presentan en gran número a lo largo de todos los cromosomas pero solo un pequeño número de ellas se resuelve como un sitio de intercambio de material genético (Lao and Hunter, 2010). Los sitios en los cuales se ha formado la unión de tipo Holliday pero que no se ha resuelto con el intercambio de material genético se denomina *non-crossover* (NCO), mientras que aquellas uniones que se resolvieron con intercambio de material genético se denominan *crossover* (CO) (Figura 1.5). Al final del zigoteno y principalmente durante paquiteno, las proteínas MLH1 (*DNA mismatch repair protein Mlh1/MutL protein 1*) y MLH3 (*DNA mismatch repair protein Mlh1/MutL. Protein 3*) del sistema de reparación MMR (*mismatch repair proteins*) se posicionan en los lugares en los cuales los intercambios (CO) se han realizado. Se han descrito diferentes proteínas implicadas en el proceso de recombinación (apartado 1.1.3.4), específicamente la proteína MLH1 (*DNA mismatch repair protein Mlh1/MutL. Protein 1*) que se describe como un marcador de los sitios de intercambio durante el sub-estadio de paquiteno (revisión de Hoffman and Borths, 2004).

La distribución de los intercambios no se establece de manera aleatoria, se localizan habitualmente en los denominados sitios calientes (*hotspots*), dichas zonas se han relacionado con aumento en secuencias específicas del tipo (ATGACGT) (McVean, 2010).

Finalmente, durante el diploteno, dictioteno y diacinesis el complejo sinaptonémico se desestructura y los homólogos únicamente quedaran unidos por los sitios en los cuales el proceso de recombinación se llevó a cabo. Estos sitios se les denomina quiasmas y se consideran como la manifestación citológica de las zonas de entrecruzamiento (*crossover*, CO) e intercambio de material genético.

#### **1.1.3.4. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA MEIOSIS.**

Los diferentes procesos que se desarrollan durante la profase meiótica (apareamiento, sinapsis y recombinación) se relacionan con la presencia y actividad de proteínas y complejos proteicos (Figura 1.6.). De manera general estas proteínas y complejos proteicos se pueden agrupar de acuerdo a su función durante la meiosis:

- proteínas relacionadas con la cohesión de las cromátides hermanas (cohesinas).
- proteínas relacionadas con el apareamiento y sinapsis (complejo sinaptonémico).
- proteínas relacionadas con la recombinación meiótica.

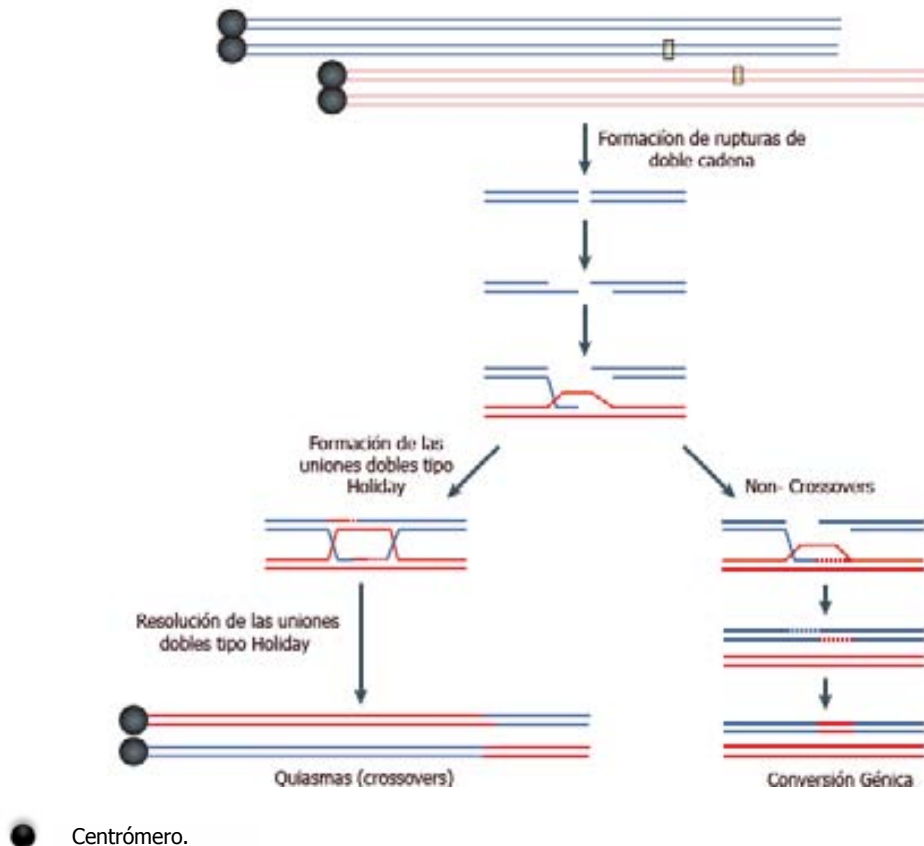
**Figura 1.5.** Patrones de recombinación cromosómica.

Imagen traducida y modificada de Lao JP, Hunter N (2010) Trying to Avoid Your Sister. PLoS Biol 8(10):e1000519. Doi:10.1371/journal.pbio.1000519.

Los grupos mencionados en cuanto a función están claramente delimitados. A continuación se describen las proteínas pertenecientes a cada uno de los grupos establecidos.

### Cohesinas

Las cohesinas son un complejo proteico que tiene como función permitir la unión y condensación entre las cromátidas hermanas, regular su disociación y permitir la correcta segregación cromosómica tanto en meiosis como en mitosis. El complejo de cohesinas está formado por cuatro subunidades que forman una estructura en forma de anillo alrededor de las cromátidas hermanas (Haering et al., 2002; Gruber et al., 2003; Ivanov and Nasmyth, 2005). A continuación se describen las diferentes proteínas que integran el complejo de las cohesinas.

**Figura 1.6.** Proteínas implicadas en el proceso de apareamiento, sinapsis y recombinación meiótica durante la primera profase meiótica.

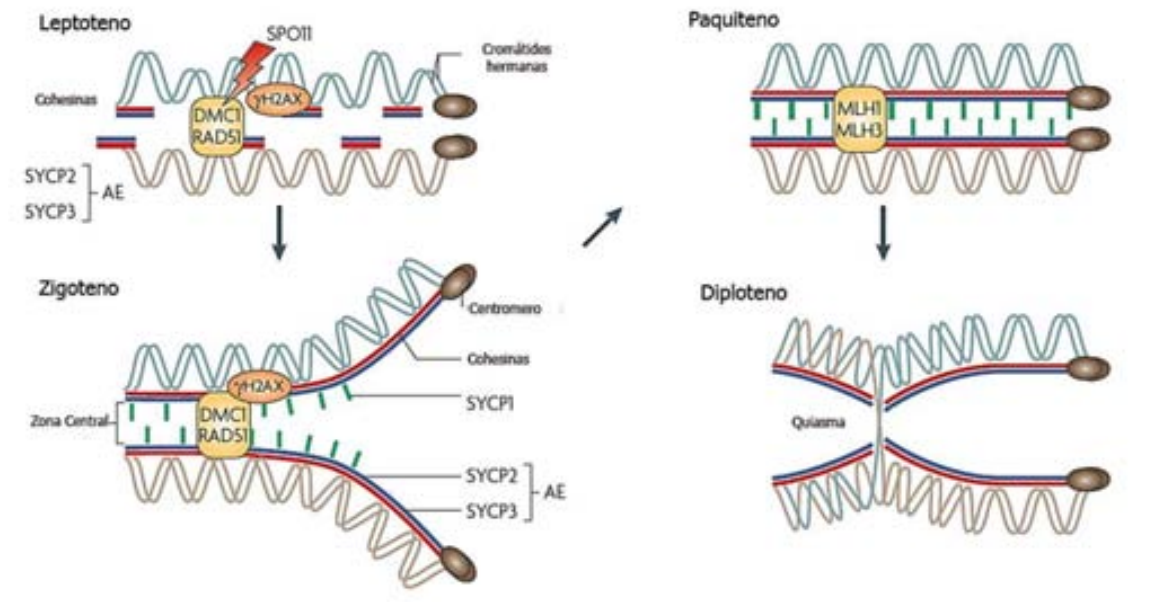


Imagen traducida y modificada de EMBO reports 6, 9, 821–825 (2005) doi:10.1038/sj.embor.7400504

- Proteínas SMC (*structural maintenance of chromosomes proteins*), pertenecen a la familia de las proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas. Se han descrito dos proteínas diferentes, la SMC1 y la SMC3. Estas proteínas, tienen como característica la formación de una estructura cuaternaria, en la cual la proteína se encuentra plegada sobre sí misma. La estructura cuaternaria que adopta permite que se genere una estructura en espiral con actividad de ATPasa en el extremo amino, mientras que en el carboxilo formará un heterodímero en forma de pinza que une ambas cromátides.
- Proteína RAD21 (*double-strand-break repair protein rad21 homolog*), pertenece a la familia de las kleisinas. Esta proteína interactúa con el dominio ATPasa de las SMC manteniendo de esta forma la estructura completa del anillo proteico que mantiene unidas las cromátides hermanas. La digestión de esta proteína mediante la enzima separasa permite desestructurar el complejo de proteínas y que la unión entre las cromátides hermanas se pierda.



- Proteínas STAG1/STAG2 (*stromal antigen 1/ stromal antigen 2*), pertenecen a la familia de las estromalinas. Estas proteínas interactúan con el dominio ATPasa de SMC y con RAD21 manteniendo la estructura en anillo proteico que mantienen unidas a las cromátides hermanas.

### **Complejo sinaptonémico**

La sinapsis se inicia durante el zigoteno, y se define como la unión física de los cromosomas homólogos mediante una estructura proteica que se denomina complejo sinaptonémico.

El complejo sinaptonémico (SC) se compone de dos elementos laterales y un elemento central. Los elementos laterales del complejo sinaptonémico se integran principalmente por las proteínas SYCP2 (*synaptonemal complex protein 2*) y SYCP3 (*synaptonemal complex 3*), mientras que el elemento central se encuentra constituido principalmente por la proteína SYCP1 (*synaptonemal complex protein 1*) (revisión de Cabero and Suarez, 2007; revisión de Alberts et al., 2007). Es importante señalar que aun cuando estas proteínas son las más abundantes, existen otras menos estudiadas dentro de la conformación de los elementos laterales y del elemento central (FKBP6, SYCE1, SYCE2 y TEX12) (Wang and Hoog, 2006; Wang et al., 2009).

Durante leptoteno, se coloca una estructura proteica filamentosa a lo largo de cada cromosoma homólogo, conocido como elemento axial (formado por los elementos laterales SYCP2 y SYCP3) (Pelttari et al., 2001). Este elemento axial se coloca sobre la estructura formada por el complejo de cohesinas que en la actualidad, puede ser considerado como parte del elemento axial. Posteriormente en zigoteno comienza la sinapsis entre los homólogos gracias al elemento central (proteína SYCP1). La proteína SYCP1 tiene la función de formar una estructura parecida a una cremallera mediante fibras proteicas que unen transversalmente los elementos laterales. Finalmente, el complejo sinaptonémico se desestructura durante el diploteno y dictioteno, quedando los cromosomas homólogos unidos únicamente en las regiones de recombinación.

A continuación se describen las características de las tres principales proteínas que constituyen el complejo sinaptonémico.

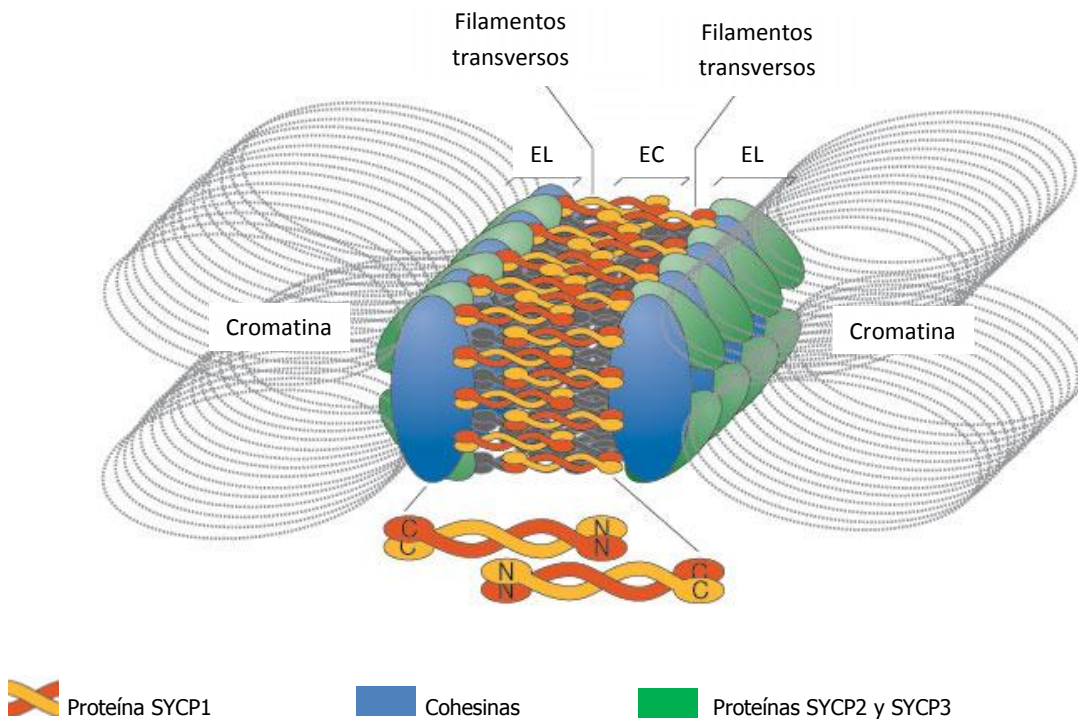
- Proteína SYCP2 (*synaptonemal complex protein 2*), pertenece a la familia de las proteínas estructurales, compartiendo características con proteínas de la matriz extracelular y lamininas. Se ha descrito que interacciona mediante su extremo carboxilo-terminal con la proteína SYCP3 (Offenberg et al., 1998) así como con el complejo de cohesinas (Ejipe et al., 2000). Es importante mencionar que esta proteína también puede localizarse en zona telómerica independientemente de la presencia de la proteína SYCP3 (Yuan et al., 2002; Liebe et al., 2004). Es más, la

presencia de la proteína SYCP2 en el elemento axial se considera necesaria para la incorporación de SYCP3 (Wang and Hoog, 2006; Yang et al., 2009).

- Proteína SYCP3 (*synaptonemal complex protein 3*), pertenece a la familia de las proteínas estructurales, compartiendo características con proteínas de la matriz extracelular y lamininas. Se considera indispensable para la formación de los elementos axiales y por tanto para que los procesos meióticos se realicen. Esta proteína forma dímeros que interactúan entre sí formando fibras de múltiples dímeros. Se ha descrito que interactúa con SYCP2 por medio de la unión a través de su extremo amino-terminal (Yuan et al., 2000; 2002; Wang and Hoog, 2006). En ratones macho en los cuales se ha suprimido la acción de la proteína SYCP3, existen grandes errores de apareamiento y sinapsis que impiden su progresión meiótica más allá del estadio de paquitenio (Yuan et al., 2000; 2002). A diferencia de lo que sucede en ratones macho, en el caso de ratones hembra a pesar de las alteraciones en el apareamiento-sinapsis y del retraso en la progresión de la recombinación, los ovocitos no quedan bloqueados en su progresión meiótica hacia paquitenio (Yuan et al., 2002; Wang and Hoog, 2006). Por otro lado se ha demostrado que su ausencia de SYCP3 no condiciona la recombinación meiótica (de Boer et al., 2006).
- Proteína SYCP1 (*synaptonemal complex protein 1*), pertenece a la familia de las proteínas estructurales y comparte características con las proteínas de la matriz extracelular y lamininas. Es el principal componente del elemento central del complejo sinaptonémico. Es una proteína dimérica, las dos unidades que la forman se ubican de forma antiparalela formando el dímero que se une a otros dímeros mediante el extremo carboxilo-terminal. Se ha descrito que la unión entre los diferentes dímeros permite la unión a las proteínas del elemento lateral del complejo sinaptonémico y a otras proteínas estructurales de los filamentos transversales como FKBP6, SYCE1, SYCE2 y TEX12 (Wang et al., 2009). Finalmente, se considera que esta proteína es indispensable para la recombinación ya que en su ausencia, este proceso no se realiza (de Boer et al., 2006).

### **Proteínas implicadas en la recombinación meiótica**

Tal como se ha comentado, la recombinación meiótica entre los cromosomas homólogos se inicia durante leptoteno con la formación de las rupturas de doble cadena. Las rupturas de doble cadena se producen por la acción de la proteína SPO11 (Keeney, 2001; Keeney and Neale, 2006; 2009). Los sitios en los cuales se han producido las rupturas se señalizan por medio de la forma fosforilada de la histona H2AX, denominada  $\gamma$ H2AX (Tang et al., 2010).

**Figura 1.7.** Esquema del complejo sinaptonémico.

EL: elemento lateral del complejo sinaptonémico  
 EC: elemento central del complejo sinaptonémico  
 N: extremo amino terminal de proteínas del elemento central  
 C: extremo carboxilo terminal de proteínas del elemento central

Imagen traducida y modificada de Page & Hawley (2004) *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 ©2004 by Annual Reviews www.annualreviews.org.

Durante zigoteno, los extremos de ADN donde se ha realizado las rupturas de doble cadena se reparan por medio de una serie de proteínas que permiten la recombinación homóloga (ATM, ATR, RAD51, DMC1, BCRA1, BCRA2, RPA y BLM). En el zigoteno tardío y principalmente durante paquiteno, dímeros de las proteínas del sistema de reparación MMR (*mismatch repair proteins*) se posicionan en los lugares en los cuales se han realizado los intercambios (CO). Existen diferentes proteínas dentro de estos sistemas de reparación, siendo la proteína MLH1 el marcador de los sitios de intercambio durante el paquiteno. Los *foci* MLH1 que se observan durante paquiteno correlacionan con el número de sitios de intercambio y su localización en humanos (revisión de Hoffman and Borths, 2004). Finalmente, durante el diploteno y dictioteno se pierde la estructura del complejo sinaptonémico y los homólogos únicamente se mantendrán unidos en los sitios en los cuales el proceso de recombinación se ha realizado. El sitio donde se mantiene la unión se le conoce como quiasma y corresponde a la manifestación citogenética de la recombinación.

A continuación se describen las principales proteínas que han sido implicadas en el proceso de recombinación meiótica.

- Proteína SPO11 (*meiotic protein covalently bound to DSB homolog*), pertenece a la familia de las topoisomerasas. Su función es de tipo trans-esterasa, lo que le permite generar rupturas de doble cadena durante el estadio de leptoteno (Bergerat et al., 1997; Keeney et al., 1997; 1999; Baudat et al., 1999; Keeney, 2001). Se considera que las rupturas de doble cadena que se generan por la proteína SPO11 son indispensables para el proceso de recombinación así como para el correcto apareamiento y sinapsis entre cromosomas homólogos tanto en levaduras como en ratón (Romanienko and Camerini-Otero, 2000; Keeney, 2001; Baudat et al., 2002). No obstante, en *C.elegans* y *D. melanogaster* se ha observado la existencia de un mecanismo de apareamiento-sinapsis diferente (revisión de Champion and Hawley, 2002) ya que en estos organismos la ausencia de la proteína SPO11 no se ve reflejada en errores de apareamiento y sinapsis pero sí en el proceso de recombinación (Keeney, 2001).
- Proteína ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated serine/threonine protein kinase*), pertenece a la familia de proteínas serina/treoninas quinasa. La proteína ATM presenta un motivo hidrofóbico (X-hydrophobic-[S/T]-Q) en el extremo amino terminal que le confiere su función quinasa (Kastan et al., 2010). Esta función quinasa le permite la fosforilación de la histona H2AX (Fernandez-Capetillo et al., 2003; Mahadevaiah et al., 2003; Fernandez-Capetillo and Nussenzweig, 2004). En células somáticas, la activación de ATM se puede triplicar posteriormente a la exposición de las células a radiación de tipo ionizante, UVA y UVB (Bannin et al., 1998; Camman and Lim, 1998; Hamer et al., 2004).
- Proteína ATR (*Ataxia-telangiectasia mutated serine/threonine protein kinase and Rad3-related protein*), pertenece a la familia de las proteínas serina/treonina quinasa. Su función se relaciona con la detección de los daños generados sobre el ADN y activación de los mecanismos reguladores de los puntos de control. Mimetizando a la proteína ATM, se considera que ATR también permite la fosforilación de la histona H2AX (Bellani et al., 2005). Una vez activados estos sistemas, la célula inhibirá la progresión del ciclo celular cuando el daño al ADN comporte riesgos importantes (Bellani et al., 2005). En el caso de células germinales, ATR se observa en regiones en las cuales el proceso de sinapsis no se ha realizado correctamente (Keegan et al., 1996; Moens et al., 1999; Perera et al., 2004; Garcia-Cruz et al., 2009). En el caso específico de ovocitos fetales humanos la presencia ATR no se observa únicamente en los sitios asinapsados (Garcia-Cruz et al., 2009)

- Proteína  $\gamma$ H2AX (*2AX histone gama*), pertenece a la familia de las proteínas estructurales de las histonas. La histona  $\gamma$ H2AX es la forma fosforilada de la histona H2AX. Su función radica en la señalización de los sitios en los cuales existe una ruptura o daño sobre la cadena de ADN. La función de señalización de la histona  $\gamma$ H2AX se comparte en procesos meióticos y mitóticos (Celeste et al., 2002; Hamer et al., 2003). Tal como ya se ha comentado, en la meiosis aparece en leptoteno justo después de la generación de rupturas de doble cadena que se producen por acción de SPO11.
- Proteínas RAD51/DMC1 (*Radiation 51 sensible protein/Disrupted meiotic cDNA1 protein*), pertenecen a la familia de proteínas homólogas a RecA de procariontes. La función de RAD51 se relaciona con el procesamiento y reparación de daño en el ADN tanto en células de tipo somático como germinal, mientras que DMC1 solo se observa en células de tipo germinal. Durante leptoteno ambas proteínas localizan los sitios donde se han generado rupturas de doble cadena. Se considera que su presencia es necesaria para la correcta reparación de las rupturas de doble cadena así como para la iniciación del proceso de apareamiento y sinapsis (Marcon and Moens, 2005; Neale and Keeney, 2006; 2009). La proteína DMC1 promueve la invasión entre las cromátidas homólogas (Yoshida et al., 1998). Existen diferencias en el patrón de aparición de la proteína con respecto al género. En el caso específico del humano, los espermatocitos solamente la presentan durante zigoteno exceptuando la región asinapsada del par X-Y que presenta señal de la proteína durante paquíteno (Barlow et al., 1997). En ovocitos humanos, el período durante el cual se presenta la proteína va desde leptoteno hasta paquíteno (Lenzi et al., 2005).
- Proteínas BRCA1/BRCA2 (*Breast cancer susceptibility proteins 1 and 2*), son proteínas producidas de la transcripción del gen supresor de tumores BRCA 1 y 2. En células somáticas están implicadas en procesos de reconocimiento de daño de ADN y reparación (Powell and Kachnic, 2003) actuando conjuntamente con RAD51. La interacción se realiza mediante los extremos carboxilos de las proteínas BRCA gracias a la actividad de su BRCT (*BRCT C-terminal domain of a breast cancer susceptibility protein*) (Liu et al., 2002; Liu and West, 2002). En células germinales de ratón se ha observado la presencia de estas proteínas durante la profase (Marcon and Monees, 2005). En el caso de ovocitos fetales humanos, su presencia es mayor durante zigoteno y en regiones en las cuales la sinapsis no se ha completado durante el paquíteno (García-Cruz et al., 2009).
- Proteína RPA (*Replication protein A*), pertenece a la familia de las helicasas de tipo RecQ (Oakley y Patrick, 2010). Es una proteína heterotrimérica que se caracteriza por que sus tres unidades tienen pesos moleculares diferentes, RPA1 (14kDa), RPA2

(32kDa), RPA3 (70KDa). La proteína RPA aparece siempre unida a las cadenas sencillas de ADN y es necesaria para la reparación de las rupturas de doble cadena (Ueno et al., 2005; Lenzi et al., 2005; Marcon and Moens, 2005; Kobayashi et al., 2010; Ueno, 2010). Se considera que participa activamente en los procesos de síntesis, reparación y recombinación del ADN (Moens, 2001).

- Proteína BLM (*Bloom's Syndrome protein*), pertenece a la familia de las helicasas del tipo RecQ (Rockmill et al., 2003; Wu and Hickson, 2003). Recibe su nombre del síndrome de Bloom, enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por alteraciones en la piel (presencia de telangiectasias y/o manchas café con leche), hipersensibilidad a la luz solar, inmunodeficiencia, retraso del crecimiento y mayor predisposición al cáncer. Los pacientes con esta enfermedad presentan una mutación en la proteína BLM que es la causante de los datos clínicos descritos. A nivel celular la mutación de la proteína se relaciona con una alta tasa de recombinación entre cromátides hermanas en células somáticas y problemas de fertilidad (Wu and Hickson, 2003). En células germinales, la proteína se ha relacionado con la resolución de nódulos de recombinación hacia puntos de no recombinación, ya que se ha observado su co-localización con las proteínas RPA y RAD51/DMC1 pero en ningún caso con la proteína MLH1 (Moens, 2001).
- Proteína MLH3 (*DNA mismatch repair protein Mlh1/MutL protein 3*), pertenece a la familia de ATPasas parecidas a la histidina quinasa (*Histidine kinase-like ATPases*). Se considera indispensable para la correcta formación de los puntos de intercambio y quiasmas. Su actividad está estrechamente ligada a la formación de heterodímeros con MLH1 (Lipkin et al., 2002). Se ha descrito que su presencia es necesaria para que MLH1 se localice en los sitios en los que se forman los puntos de recombinación (Lipkin et al., 2002). Se considera también que su presencia en los sitios de recombinación induce la defosforilación de  $\gamma$ H2AX dejando esta de señalar así los sitios de ruptura de doble cadenas (Lenzi et al., 2005).
- Proteína MLH1 (*DNA mismatch repair protein Mlh1/MutL Protein 1*), pertenece a la familia de las ATPasas parecidas a la histidina quinasa (*Histidine kinase-like ATPases*). Esta proteína tiene actividad de reparación y aparece durante la profase meiótica al igual que MSH4/MSH5 y MLH3. MLH1 actúa en forma de dímero junto con MLH3 promoviendo la formación de los puntos de recombinación (Snowden et al., 2004) y por tanto se considera que MLH1 es la proteína marcadora de puntos de recombinación por excelencia durante la profase meiótica (Baker et al., 1996; Thibodeau et al., 1996; Hunter and Borts, 1997; Marcon and Moens, 2005). Se considera indispensable para la correcta formación de los puntos de intercambio y

quiasmas. Debido a estas características esta proteína se ha empleado como marcador por excelencia para el estudio y caracterización de la recombinación tanto en ratones como en humanos (Barlow and Hulten, 1998; Froenicke et al., 2002; Tease et al., 2002; Oliver-Bonet et al., 2003; Kolas and Cohen, 2004; Kolas et al., 2004; Lynn et al., 2004; Codina-Pascual et al., 2004; Tease et al., 2004; Oliver-Bonet et al., 2005; Lenzi et al., 2005; de Boer et al., 2006; Sun et al., 2006; Robles et al., 2007; 2009). Tal como ya se ha comentado, esta proteína también ha sido analizada de manera concreta en ovocitos humanos por diferentes grupos. Los estudios realizados en ratón y en humano han demostrado la existencia de una relación entre la longitud del complejo sinaptonémico y el número de puntos de recombinación sobre el bivalente, es decir los cromosomas de mayor longitud presentarán un mayor número de *foci* de MLH1 que los de menor longitud. En el caso específico de los espermatoцитos humanos la proteína MLH1 se puede observar desde el paquiteno hasta diploteno (Codina-Pascual et al., 2005; Oliver-Bonet et al., 2003), a diferencia de lo que sucede en ovocitos humanos en los cuales este periodo es más prolongado (Lenzi et al., 2005; Robles et al., 2007; 2009). El período durante el cual es posible observar MLH1 en ovocitos humanos va desde zigoteno hasta diploteno (Vallente et al., 2006; Cheng et al., 2009). Otra característica especial de la proteína MLH1 es la diferencia en el número de *foci* que presentan los ovocitos con respecto a los espermatoцитos. Los ovocitos presentan un número de *foci* entre los 45 y 50, mientras que el número de *foci* que se observan en espermatoцитo es de 35 a 45 (Lenzi et al., 2005; Cheng et al., 2009; Robles et al., 2009). Por otro lado, la localización en espermatoцитos suele comprender las regiones subtelo méricas o más terminales mientras que en ovocitos se localizan principalmente en las regiones intersticiales (Barlow and Hulten, 1998; Tease et al., 2002).

- Proteínas RAD51C/XRCC3 (*Radiation 51 protein sensible C/ X-ray repair cross-complementing protein 3*), pertenecen a la familia de las helicasas. Son dos proteínas de tipo paralogas a RAD51, con la que conservan una homología de 20-30% (Rodrigue et al., 2006; Nagaraju et al., 2009). En células somáticas, estas proteínas están involucradas en procesos de reparación de ADN básicos para mantener la estabilidad genómica (Rodrigue et al., 2006; Nagaraju et al., 2009). En células germinales esta proteína aparece con un patrón numérico similar al de MLH1 y en el caso de espermatoцитos durante las mismas etapas de la meiosis (paquiteno y diploteno) (Liu et al., 2007). En animales con alteración en la expresión de estas proteínas, los ovocitos progresan normalmente hasta metafase I pero en metafase II se observan rupturas cromosómicas, separación precoz de cromátides hermanas y sobretodo aneuploidías en

la descendencia (Kuznetsov et al., 2007). En animales macho, esta alteración produce esterilidad (Kuznetsov et al., 2007).

## **1.2. CULTIVO DE OVOCITOS FETALES.**

La gametogénesis tal y como se ha descrito en el apartado 1.1, es un proceso que se inicia en la vida fetal y en el caso de los ovocitos solo concluye cuando es fecundado. Durante todo este período, que puede ser de décadas, el ovocito se expone a factores hormonales y medioambientales (exposición a fármacos, químicos y radiaciones) que pueden alterar su desarrollo y crecimiento. Entre todos los eventos que suceden durante la gametogénesis, sin duda el apareamiento, sinapsis y recombinación, que tienen lugar durante la profase I, probablemente sean de los más importantes. Las alteraciones en estos procesos se han relacionado con un incremento en la degeneración de los ovocitos, bajas reservas ováricas y alteraciones cromosómicas numéricas. Lamentablemente estos eventos críticos que suceden en la profase I, han sido estudiados solo por un grupo reducido de investigadores debido a la dificultad para la obtención de muestras humanas, así como por las limitaciones éticas que su estudio conlleva.

Pese a dichas limitaciones en la obtención de muestras, la profase I femenina humana ha sido evaluada mediante técnicas de citogenética clásicas (Ohno et al., 1962; Baker, 1963; Blandau, 1969; Kurilo, 1981; Bojko, 1983; Speed, 1985; Garcia et al., 1987; Garcia et al., 1989), hibridación *in situ* acoplada a fluorescencia (FISH) (Cheng and Gartler, 1994; Cheng et al., 1995; Cheng et al., 1998; Cheng et al., 1999; Cheng and Nalwai-Cecchini, 2004; Roig et al., 2005; 2006; Robles et al., 2009; Garcia-Cruz et al., 2010) y más recientemente inmunofluorescencia (IF) (Barlow and Hultén, 1997; Hartshorne et al., 1999; Tease et al., 2002; Roig et al., 2004; Lenzi et al., 2005; Roig et al., 2005; 2006; Robles et al., 2009; Garcia-Cruz et al., 2010).

Si los procesos *in vivo* se han estudiado poco, los posibles modelos de cultivo de ovocitos fetales humanos lo han sido aún menos. Los reportes más antiguos con respecto a cultivo de ovocitos fetales datan de 1969 (Blandau, 1969) y desde entonces diversos investigadores han descrito algunas mejoras en la técnica de cultivo (Hartshorne et al., 1999; Lyrakou et al., 2002; Roig et al., 2006). La mayor parte de estos estudios se han basado en técnicas de cultivo de ovocitos obtenidos de tejido ovárico adulto. Los avances en las técnicas de cultivo de tejido ovárico adulto se han extrapolado a tejido fetal tanto de ratón como humano, pero los resultados han sido muy variables en relación con la supervivencia de los ovocitos así como con la progresión meiótica. Es importante mencionar que los resultados que han sido publicados con respecto al cultivo de los ovocitos fetales son resultado de una combinación de técnicas de cultivo, factores de crecimiento, y hormonas. Con el objetivo de hacer más claros los beneficios de los factores de crecimiento y hormonas así como las técnicas de cultivo, cada una se describe de manera extensa en los siguientes apartados (1.2.1. y 1.2.2.).



### 1.2.1 FACTORES DE CRECIMIENTO Y HORMONAS.

Los factores de crecimiento y hormonas se han relacionado con un efecto positivo en el crecimiento y progresión de los ovocitos *in vitro*. Los efectos positivos de estos factores se han observado de manera principal en modelos de cultivo de ovocitos proveniente de tejido ovárico adulto tanto de animales (ratón, cerdo, vaca y cabra) como de humanos. La obtención de muestras de tejido adulto ha facilitado el desarrollo de métodos, medios de cultivo y matrices específicas necesarias para cultivar ovocitos provenientes de tejido ovárico adulto. Aun cuando se ha mencionado en apartados previos (1.1., 1.1.2.1. y 1.1.3.1.) es importante comentar que los ovocitos en profase I (ovocitos fetales), tienen características diferentes a las que se observan en ovocitos provenientes de otras fases de la meiosis. A continuación se mencionan los factores de crecimiento y hormonas que han sido empleados en el cultivo de ovocitos fetales.

- Hormona folículo estimulante (FSH, *Follicle stimulating hormone*) y hormona luteinizante (LH, *Luteinizing hormone*). Las células de la granulosa presentan receptores para FSH y la activación de estos receptores de membrana activa la síntesis de ARN codificante para su receptor, lo que permite el aumento del número de receptores y por tanto la acción de la hormona. Niveles altos de LH estimulan a las células de la granulosa, teca interna y teca externa para que produzcan estradiol. La elevación en la concentración de estradiol permite la diferenciación de folículo primario a folículo secundario (Thomas et al., 2003; Thomas and Vanderhyden, 2006).
- Factor inhibidor de la leucemia (LIF, *Leukaemia inhibitory factor*). El efecto de LIF en ovocitos es mediado por la inducción de quinasas activadas por mitogénos (*MAPK, mitogen activated protein kinases*), que permiten la formación de AMPc. Tanto MAPK como AMPc, se relacionan con la activación de la cascada intracelular activada por FSH. Las respuestas celulares activadas se relacionan con la maduración del ovocito por medio del aumento en la población de células del cúmulo, así como por una disminución en su degeneración mediada por activación de Ras (De Felici et al., 2009)
- Factor de crecimiento parecido a la insulina (ILGF, *Insulin-like growth factor*). Su efecto consiste en la activación de receptores que permiten el crecimiento celular por medio de la estimulación de los transportadores de glucosa de tipo GLUT (*GLUT, glucose transporter type*) así como receptores acoplados a segundos mensajeros del tipo tirosina quinasa habitualmente activados por insulina. La activación de los receptores se ha relacionado con el aumento de volumen celular e incremento en la síntesis de proteínas (Sakuguchi et al., 2000; Iwata et al., 2004).
- Insulina. Es una hormona polipeptídica que tiene como función la entrada de glucosa y aminoácidos a la célula. Se considera que funciona como factor de crecimiento y

promueve la mitosis. En folículos se le relaciona con la maduración de ovocitos *in vitro* (Abdelahi et al., 2008)

- Selenio. El selenio es un elemento esencial en diversos procesos fisiológicos de síntesis proteica. En los sistemas de cultivo celular su función es de protector celular ante el estrés oxidativo, ya que el selenio disminuye la producción de radicales libres e inhibe la peroxidación lipídica. Su uso en folículos preantrales se asocia a un incremento en la tasa de maduración folicular (Abdelahi et al., 2008)
- Transferrina. Es una proteína transportadora de hierro, el hierro es un elemento esencial en diversos procesos fisiológicos. Su función como factor de crecimiento se asocia a la inducción de la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis, sino también el mantener la supervivencia celular, estimular la migración celular, la diferenciación celular e incluso como regulador de la apoptosis (Trazzi et al., 2009).
- Factor de crecimiento de células madre o troncales (SCF, *Stem cell factor*). Este factor de crecimiento comparte ligandos con otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento ligado al acero y el factor de crecimiento de mastocitos. Las células germinales expresan en gran cantidad su ligando c-KIT (CD 161) permitiendo de este modo la proliferación celular e inhibiendo procesos apoptóticos. Se ha descrito que el SCF actúa mediante la activación de su receptor que tiene actividad de tirosina quinasa tipo III. El receptor al ser activado forma dímeros y es autofosforilado. Posteriormente, el receptor fosforilado activa rutas intracelulares, tales como la proteína quinasa-quinasa activada por mitógeno (MAPKK), ciclinas, quinasa Janus -2, quinasa de fosfatidilinositol, Fosfolipasa Cy1, activación de protooncogen RAS, proteína de retinoblastoma RB entre otras muchas cascadas de activación. En la actualidad, se desconoce cuál de ellas es la vía prioritaria, sin embargo sus efectos como factor de crecimiento celular, factor de división celular e inhibidor de la apoptosis se encuentran bien documentados (Dolci et al., 1993; De Felici et al., 1996; Grimaldi et al., 2002; Bedell and Zama 2004; Matsui, 2010).
- Suero bovino fetal (FCS, *fetal calf serum*). El suero bovino fetal se ha empleado de manera rutinaria en el cultivo de tejidos desde hace décadas ya que funciona como regulador de osmolaridad y como fuente de aporte de purinas. El FCS contiene altas concentraciones de purinas y estudios recientes indican que concentraciones elevadas de FCS impiden la correcta actividad de segundos mensajeros como el AMP cíclico, bloqueando de esta manera la activación de respuestas celulares (Miyano et al., 2005). Además del FCS, el suero específico para células madre así como el suero humano femenino se han empleado en el cultivo de ovocitos y folículos. La función principal de

estos dos tipos de suero es equivalente a la descrita para FCS. Las diferencias entre ellos radica en la pureza, así como la concentración de factores de crecimiento.

### 1.2.3. MODELOS DE CULTIVO.

Tal y como se ha comentado en relación a los factores de crecimiento y hormonas, las técnicas empleadas en el cultivo de los ovocitos fetales humanos y de ratón tienen sus fundamentos en las técnicas desarrolladas para tejido ovárico adulto. Debido a que una técnica de cultivo implica factores como el método de disgregación, el método de siembra, el medio de cultivo empleado así como un adecuado método de resiembra, el resultado que se observa finalmente es dependiente del equilibrio de todos ellos. En el apartado previo (1.2.2.) se ha descrito la función de cada uno de los factores de crecimiento y hormonas que se han empleado en cultivo. En este apartado se describen los modelos integrales, es decir el resultado que se ha observado al ser empleados diferentes medios de cultivo, factores de crecimiento, hormonas, métodos de disgregación, etc.

A continuación se mencionan los modelos de cultivo (estudios) que se han empleado en tejido ovárico fetal de acuerdo a su orden cronológico.

- 1969, Blandau. Se trata del estudio más antiguo, en el cual se describió la presencia de ovogonias y ovocitos fetales humanos en cultivo durante 80 días. Durante el periodo de cultivo se observó la diferenciación de las ovogonias, divisiones mitóticas, crecimiento del tejido fetal así como progresión de la meiosis en cultivo. En este modelo de cultivo se describió la presencia de folículos secundarios y antrales en las muestras de tejido cultivado con MEM y suplementado con suero bovino fetal 5%.
- 1995, Zhang et al. Mediante la utilización de fragmentos ováricos provenientes de fetos humanos de entre 16 y 20 semanas de gestación, observó la presencia de folículos primordiales e incluso la obtención de óvulos con la capacidad de expulsar el corpúsculo polar. El modelo se basó en el cultivo de los ovocitos en medio de cultivo Waymouth y suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  (2.1g/L), suero bovino fetal 15%, hormona folículo estimulante (FSH 0.03IU/ml), insulina (35ng/ml) y penicilina (100U/ml).

Tanto Blandau (1969) como Zhang et al., (1995) describieron la obtención de células germinales morfológicamente normales, pero en ninguno de los dos modelos de cultivo se evaluó el proceso meiótico de una forma específica es decir analizando los procesos de apareamiento, sinapsis, recombinación y segregación. Por otro lado, los resultados obtenidos en ambos casos no han sido reproducibles ya que la variabilidad en los resultados tanto intramuestra como inter-muestra en relación a viabilidad de ovocitos y obtención de células morfológicamente normales fue demasiado elevada.

- 1999, Hartshore et al. Mediante la utilización de mini-bloques de 0.3mm x 0.3mm x 0.3mm de ovarios fetales de ratón de edad gestacional de entre 13 y 16 días

describió la progresión meiótica en ovocitos cultivados. El modelo se basó en el cultivo del tejido ovárico en medio de cultivo  $\alpha$ MEM (*minimal essential medium alpha*) y suplementado con suero bovino fetal al 10% y hormona folículo estimulante (FSH) (100mIU/ml). Además se evaluó el efecto del suero humano femenino y el suero bovino fetal específico para células madre. Los cultivos se analizaron después de ser cultivados durante periodos de entre 7 y hasta 40 días. Los autores observaron un incremento en los porcentajes de ovocitos en estadio de zigoteno y paquiteno directamente proporcional a los días de cultivo. Los ovocitos que se cultivaron con suero humano femenino y suero bovino fetal específico para células madre, mostraron el mayor incremento en el número total de ovocitos a los 14 días de cultivo. Los ovocitos cultivados con este método mostraron la presencia del elemento lateral del complejo sinaptonémico (SYCP3) indicando la progresión meiótica. Los autores no evaluaron la presencia de MLH1.

- 2002, Lyrakou et al. Mediante la utilización de un modelo de ratón estudiaron 162 ovarios de fetos de edad gestacional de 13 a 17 días. Los ovarios fueron cultivados en medio de cultivo control compuesto por:  $\alpha$ MEM suplementado con 5% FCS específico para células madre, penicilina (100UI/ml) y estreptomycin (50 $\mu$ g/ml), SCF (100ng/ml), factor de crecimiento parecido a insulina (ILGF, 50ng/ml) y LIF (100ng/ml). Los cultivos se analizaron evaluando el proceso de apareamiento y sinapsis, así como la recombinación después de un periodo de 3 o 4 días de cultivo. Los autores observaron un incremento en el número de ovocitos que progresaron de leptoteno a paquiteno después de 4 días de cultivo. Sin embargo el incremento solo alcanzó el 50% de los valores (número de ovocitos) iniciales, además con ninguno de los dos medios de cultivo empleados se observó la presencia de la proteína MLH1.
- 2006, Roig et al. Mediante la utilización de bloques de tejido ovárico describieron un método de cultivo que permitió la progresión de los ovocitos a través de la profase I. Los autores emplearon un sistema en el cual el ovario fue segmentado en bloques de tejido de aproximadamente 15mm x 20mm x 20mm y posteriormente cultivados en medio de cultivo  $\alpha$ MEM suplementado con 2% albúmina humana, insulina (5 $\mu$ g/ml), transferrina (5 $\mu$ g/ml), selenio (5ng/ml), penicilina (100IU/ml) y estreptomycin (100 $\mu$ g/ml). Los bloques de tejido fueron cultivados por un período de entre 1 y 5 semanas. Los resultados publicados por estos autores demostraron que independientemente de las condiciones de cultivo, los ovocitos lograron sobrevivir hasta las 5 semanas de cultivo y en 3 de los 4 casos analizados, se observó progresión meiótica. Sin embargo, los porcentajes de ovocitos en cada una de las etapas de la profase, entre los diferentes casos, no siguieron un patrón específico descrito en

ovocitos no cultivados. Por otro lado, es importante recalcar que la tasa de eficiencia en el apareamiento y sinapsis descrita fue similar a la de ovocitos no cultivados. Finalmente, los autores observaron un incremento en los ovocitos degenerados en relación al tiempo de cultivo. La recombinación meiótica no fue valorada en este estudio.

### **1.3. DISRUPTORES HORMONALES.**

Los disruptores hormonales son sustancias químicas que interfieren con el sistema endocrino de los seres vivos. El efecto causado por los disruptores hormonales puede producir respuestas endocrinas de tipo agonista así como antagonista con respecto a la hormona que mimetizan (Organización Mundial de la Salud 2003; Von Saal and Hughes, 2005). Los disruptores hormonales pueden afectar el crecimiento, división y muerte celular (Von Saal and Hughes, 2005). Se considera además que los disruptores hormonales pueden afectar procesos, metabólicos, neurológicos, inmunológicos y reproductivos de los organismos (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2003).

#### **1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS DISRUPTORES HORMONALES.**

Dentro de la clasificación de disruptores hormonales se encuentra un amplio espectro de sustancias de origen natural y sintético. Este amplio espectro está formado por sustancias tales como: fármacos, dioxinas, sustancias parecidas a dioxinas (*dioxin-like*) bisfenoles policlorados, plaguicidas y plastificantes (como Bisfenol A). Los disruptores hormonales se pueden encontrar en productos de uso diario incluyendo botellas de plástico, latas de alimentos, detergentes, retardantes de flama, juguetes, cosméticos y biberones (National Institute of Environmental Sciences, USA, NIEHS, 2010).

Las sustancias químicas con actividad de disruptor hormonal que actualmente se encuentran en uso, se agrupan de la siguiente manera: plaguicidas, químicos órgano-halogenados, plásticos, químicos industriales y xenoestrógenos (European Union Assessment Reports, 2008; US Environmental Protection Agency (EPA), 2010).

#### **1.3.2. BISFENOL A (BPA).**

El BPA pertenece a la familia de las sustancias químicas de uso industrial. La actividad del compuesto sobre receptores de estrógenos y su posible acción sobre la fertilidad, pubertad precoz, endometriosis, cáncer de mama, de vagina, de útero o cáncer de próstata lo ha colocado en el punto de mira de los científicos y de las agencias gubernamentales (Consumer Reports, 2000; Weitzman, 2005; Maffini et al., 2006; Willhite et al., 2008).

El Bisfenol A es una de las sustancias químicas que se producen en mayor cantidad a nivel mundial ya que cada año se producen cerca de 6 billones de toneladas y durante su producción mas de 100 toneladas son liberadas a la atmósfera. La producción mundial se encuentra distribuida en un 48% en los Estados Unidos de Norte América, 32% en Europa y 20% en Japón (Cousins et al., 2002). La tasa de producción y utilización en países considerados emergentes (China, Brasil, India, Rusia y México) no se tiene registrada (Willhite et al., 2008).

Entre un 65 y un 70% del BPA que se produce a nivel mundial es utilizado por compañías que producen plásticos del tipo policarbonato y resinas epoxy (Cagen et al., 1999). Los plásticos y resinas epoxy que se obtienen del compuesto se utilizan como estabilizadores de plástico y anticorrosivos en tubos, latas para conservas, filtros de agua, material de embalaje de comida, biberones y resinas dentales (Morrisey et al., 1987; Brotons et al., 1995; Olea et al., 1996; Pulgar et al., 2000).

### 1.3.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL BPA.

El Bisfenol A (BPA) o 2,2-bis (4hidroxifenil) propano (CAS# 80-05-7) se considera como un disruptor hormonal con actividad sobre receptores de estrógenos. El BPA es un compuesto orgánico constituido por dos anillos fenólicos y que cuenta con dos metilos como grupos funcionales. El BPA, tiene varios sinónimos como 2,2-bis-(p-hidroxifenil)-2-propano, 4,4'-isopropilidene-2-difenol y 4,4 (1-metiletilideno) bisfenol entre otros (revisión de Vandenberg et al., 2009) pero la estructura del compuesto siempre es la misma. A continuación se muestra la estructura del BPA (Figura 1.7.).

**Figura 1.7.** Estructura tridimensional de BPA.

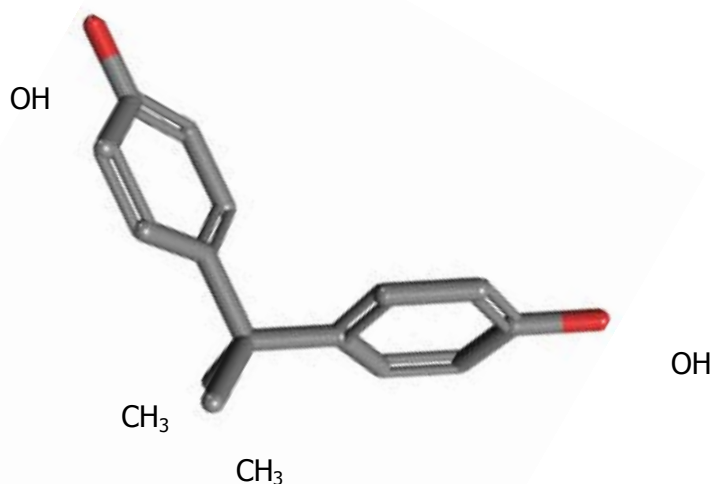


Imagen modificada de base de datos de estructuras químicas del NCBI, [www.NCBI.org](http://www.NCBI.org).

La estructura del compuesto le confieren características especiales tanto químicas como físicas, dichas características se muestran en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Características físicas y químicas del BPA.

Propiedad	Valor	Referencia
Formula empírica	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	ChemIDplus, 2006
Número del CAS	80-05-7	ChemIDplus, 2006
Peso Molecular	228.28	Budavari et al., 2001
Estado físico y color	Hojuelas blancas	Lewis, 1997
Punto de fusión	153°C	ChemIDplus, 2006
Punto de ebullición	220°C	Lewis, 1997
Densidad	1.1-1.2kg/m <sup>3</sup>	EU, 2003
Presión de vapor	3.91E-07mmHg a 25°C	ChemIDplus, 2006
Solubilidad en agua	120-300 mg/L a 25°C	Staples et al., 1998
pKa	9.59-11.30	Cousins et al., 2002
Coefficiente de partición	3.3/3.2	Miyakoda et al., 2000
Constante de partición aire/agua	1.00E-11 atm·m <sup>3</sup> /mol a 25°C	ChemIDplus, 2006

CAS: identificación numérica única para compuestos químicos identificación numérica única para compuestos químicos.

pKa: logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil.

Revisado, traducido y modificado de Vandenberg 2007, 2009 y 2010, base de datos de [www.NCBI.nlm.nih.gov](http://www.NCBI.nlm.nih.gov)

En relación a las características organolépticas del BPA, solo se ha descrito que tiene un aroma fenólico débil (Budavari et al., 2001).

#### 1.3.4. RUTAS DE EXPOSICIÓN.

La especie humana se encuentra expuesto al BPA mediante diferentes rutas de exposición como pueden ser la inhalatoria, la dérmica y la transplacentaria (European Food Safety Agency (EFSA), 2007), pero sin duda, la vía oral es la principal. Las cifras que se han estimado en relación a la exposición vía oral en el humano es de 0.00048mg/kg por día a 0.009 mg/kg día (Gray et al., 2004; EU, 2003), pero estas cifras se modifican de acuerdo al tejido analizado, la edad, el género y nivel socioeconómico de la persona estudiada. A continuación se describen las vías de exposición al BPA en el humano.

#### Agua

La solubilidad en agua del BPA varía de 120mg/ml a 300mg/ml (Dorn et al., 1997; Staples et al., 1998). De hecho, el BPA puede ser detectado en aguas residuales de fábricas

debido a que en estas aguas no se remueven completamente en el proceso de tratamiento de las aguas residuales industriales, por lo que se les considera como una fuente abundante de contaminación acuática (Lee and Peart, 2000).

De todas formas, el BPA puede ser degradado parcialmente por bacterias propias de las grandes masas de agua (lagos, embalses y lagunas) (Fromme et al., 2002; Belfroid et al., 2002). Existe un tipo de bacterias que tienen la capacidad de degradar y eliminar hasta el 90% del compuesto (*Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Streptomyces sp*) (Kang et al., 2004). No obstante, aun cuando puede existir la biodegradación por bacterias en el agua de ríos y lagos, los organismos acuáticos expuestos al BPA durante 3-5 días, muestran efectos en su sistema endocrino (Kondo et al., 2006).

Las grandes masas de agua salada (mares y océanos) deben de ser tomadas en cuenta de manera particular. En agua salada el tiempo de persistencia del compuesto se prolonga debido a que las especies bacterianas que lo degradan no están presentes (Ying and Kookana, 2003). La ausencia de estas bacterias provoca que las especies marinas de consumo humano puedan presentar niveles de BPA bastante mayores (13.3ng/g a 213.1ng/g).

## **Aire**

La exposición inhalatoria al BPA sucede principalmente en personas que trabajan en sitios donde se produce, transporta o embala el compuesto (Morrisey et al., 1987; Goubing et al., 2005). En estos lugares de trabajo además de inhalar el compuesto, existe la posibilidad de ingestión posterior a la manipulación de las hojuelas del compuesto (EFSA, 2002). En los individuos expuestos de manera ocupacional los niveles de BPA en orina son mayores que en el resto de la población (111mg/g de creatinina) (Poole et al., 2004). El tiempo necesario para la foto-oxidación del BPA en aire es de 0.74 a 7.4 horas (Rudel et al., 2001), por lo que la posibilidad de inhalar aire contaminado con este compuesto en la población general es realmente baja.

## **Suelo**

El coeficiente de adsorción del suelo para el BPA tiene un rango de 314mg/k a 1524mg/k cuando se calcula usando su solubilidad del agua (Howard et al., 1989), lo que indica que el suelo tiene la capacidad de absorber el compuesto. En este sentido los niveles de BPA en sedimentos de ríos, lagos y mares son mayores que en agua superficial (Fromme, 2002). La vida media del BPA en el suelo es de 3 días (Fent et al., 2003) y la mayor fuente de contaminación en suelo son los residuos humanos, cuyos niveles dependen de la densidad poblacional de la zona (Kawahata et al., 2004).



## Vía oral

La principal fuente de exposición en el humano es la vía oral ya que el BPA tiene la capacidad de migrar de los contenedores de plástico y latas a los alimentos que contienen (Bailey, 1996; Imanaka et al., 2001; Goodson et al., 2002; Inoue et al., 2003; Murguía-López et al., 2005).

Cerca del 80% de los residuos presentes en el material de recubrimiento de latas migra a los alimentos inmediatamente después del proceso de envasado (Goodson et al., 2004). La migración del compuesto a partir de los recubrimientos de latas, se relaciona directamente con: la elevación de temperatura de los alimentos y recipientes al ser esterilizados, el vehículo en el que son envasados, el pH del vehículo, el proceso de cocción en microondas y la ebullición (Biles et al., 1997; Murguía-López et al., 2001; López-Cervantes y Paseiro-Losada, 2003; etc).

La migración de BPA a partir de los recipientes de plástico (botellas, biberones y fiambreras), se relaciona con el tiempo de uso del recipiente. Por ejemplo, en biberones la liberación (migración) del compuesto se relaciona al tiempo de uso y al daño en estructura de la superficie del recipiente (Takao et al., 1999; Brede et al., 2003). La migración más alta del compuesto se ha observado en biberones fabricados con policarbonato (Wong et al., 2005) que al ser lavados y esterilizados con soluciones alcalinas, liberan 5 veces más BPA (D'Antuono et al., 2001).

## Exposición transplacentaria

La exposición transplacentaria es una de las vías menos estudiada. Los estudios iniciales indicaban que no existía posibilidad de exposición fetal al compuesto ya que la conjugación a nivel hepático y excreción renal en el adulto son altas. En la actualidad y en base a algunos estudios en los cuales se ha cuantificado BPA en líquido amniótico y placenta se puede decir que además de la exposición existen posibilidades de ser bioacumulado en estos tejidos y fluidos (Balakrishnan et al., 2010; Avissar-Whiting et al., 2010; Zhang et al., 2011). Actualmente, existe un gran debate acerca de dicha bioacumulación en el feto humano y sus efectos a largo plazo, pero los estudios que han sido publicados no son suficientemente robustos como para ser concluyentes.

### 1.3.5. NIVELES DE BPA EN FLUIDOS Y TEJIDOS HUMANOS.

Los niveles en fluidos y tejidos humanos son sin duda uno de los puntos en debate en relación al BPA. Se han empleado diversas metodologías para su detección, cada una de ellas con resultados radicalmente opuestos. Los resultados que se han descrito corresponden básicamente a dos formas diferentes de BPA, el BPA-libre (forma usualmente considerada como tóxica) y el BPA-conjugado (forma metabolizada y usualmente considerada como no tóxica). A continuación se muestra un compendio de los resultados descritos en cada uno de los fluidos y tejidos humanos.

### **Suero, plasma y sangre**

Desde finales de los años 90 se han realizado diversos estudios con el objetivo de determinar la concentración de BPA en suero humano, para ello se han aplicado una gran batería de pruebas de química analítica (Sajiki et al., 1999; Fung et al., 2000; Inoue et al., 2001; Ikezuki et al. 2002; Schonfelder et al., 2002). Las concentraciones de BPA libre que han sido descritas en suero humano se encuentran dentro de un rango que va desde 0.02ng/ml hasta 20ng/ml (Schonfelder et al., 2002). Sin embargo, la discrepancia entre los valores descritos tanto en unidades como concentraciones hacen difícil la comparación de los estudios (revisión de Vandenberg et al., 2009).

### **Fluidos y tejidos asociados al embarazo (líquido amniótico, placenta y cordón umbilical)**

Los niveles elevados de BPA libre que se han reportado en sangre de cordón umbilical, suero materno durante la gestación, líquido amniótico y placenta han incrementado el debate de los efectos de la exposición transplacentaria (Ikezuki et al., 2002; Schonfelder et al., 2002; Yamada et al., 2002; Tan et al., 2002). Los valores que se han detectado en el plasma de mujeres embarazadas con una edad gestacional de entre 15 y 18 semanas son de entre 1.4ng/ml a 2.4ng/ml mientras que los valores que se han descrito en líquido amniótico son 8 veces mayores (8.3 ng/ml). Las concentraciones que se han descrito en tejido placentario varían de 11.2ng/g a 104.9ng/g (Schonfelder et al., 2002). En este sentido, se considera que de acuerdo a valores de BPA descritos en suero fetal y placenta, el feto humano se encuentra expuesto al BPA durante su proceso de crecimiento y desarrollo; y que las concentraciones *in utero* pueden alcanzar rangos hasta 10 veces mayores que los descritos en adultos (Balakrishnan et al., 2010; Avissar-Whiting et al., 2010; Zhang et al., 2011).

### **Leche materna**

La exposición al BPA a través del consumo de la leche materna, se considera como una ruta de exposición importante para la salud y desarrollo del neonato. Los estudios realizados en leche materna de mujeres sanas han mostrado concentraciones de BPA de 0.28ng/ml a 0.97ng/ml (Sun et al., 2004). En el 60% de las muestras de leche materna de mujeres sanas se observó BPA en su forma libre y hasta un 90% presentan combinaciones de forma libre y forma conjugada (Yet et al., 2004). Es importante señalar que la concentración más alta de BPA en leche materna se ha observado en el calostro (1-7ng/ml) (Yet et al., 2004).

### **Orina**

Los niveles de BPA en orina se han evaluado en diversas poblaciones (población abierta a población general, trabajadores de fábricas, niños etc.). Dichos estudios han confirmado la amplia

distribución del compuesto. La mayor parte del BPA detectado en orina se encuentra en su forma conjugada (BPA-glucoronido o BPA-sulfato). Se considera que entre un 90% y un 95% de la población presenta niveles detectables del compuesto en orina (0.01ng/ml) independientemente de la edad, sexo o lugar de residencia (Calafat et al., 2005; Wolff et al., 2007). Los estudios han descrito que la concentración promedio en población de los Estados Unidos de Norte América es de 1.63ng/ml en hombres y 1.12ng/ml en mujeres (Calafat et al., 2005; Wolff et al., 2007; Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2008). Las diferencias con respecto a sexo son contradictorias, ya que los rangos de concentración se encuentran dentro de los mismos niveles. La diferencia más importante con respecto al sexo es el tipo de conjugado encontrado en orina, los individuos del género masculino presenta mayores concentraciones de la versión glucoronizada y las mujeres de la versión sulfatada sin que tenga una repercusión clínica (Ouichi y Watanabe, 2002; Matsumoto et al., 2003; Kim et al., 2003).

### **Líquido folicular y líquido seminal**

Debido a las características del líquido folicular y su dificultad de obtención, solo existen unos pocos estudios con respecto a la concentración de BPA en este tipo de fluido (Ikezuki et al., 2002). Los niveles de BPA que se han encontrado en líquido folicular de mujeres en tratamientos de reproducción asistida son de 2.0ng/ml (Ikezuki et al., 2002). No se han descrito los valores de BPA en mujeres en edad reproductiva que no han seguido tratamientos de reproducción asistida.

Con respecto a los valores de BPA en líquido seminal se considera que en el mismo no existen concentraciones detectables (Inoue et al., 2002; Kayatama et al., 2003).

### **1.3.6. METABOLISMO DEL BPA.**

En humanos, los mecanismos de absorción, distribución y eliminación del BPA se han analizado mediante estudios indirectos y retrospectivos. Las dificultades para encontrar personas no expuestas al BPA y las limitaciones éticas de los estudios con humanos han sido las causas principales del déficit de conocimiento al respecto (revisión de Vanderberg et al., 2007). Sin embargo, para comprender estos procesos se han utilizado diferentes modelos animales.

La distribución y eliminación del BPA y sus metabolitos después de su administración oral han sido estudiados en ratas en edad reproductiva (Knaak and Sullivan, 1966; Pottenger et al., 2000; Snyder et al., 2000; Kurebayashi et al., 2003), embarazadas (Degen et al., 2001; Domoradzki et al., 2003) y neonatas (Snyder et al., 2000); en ratón (Zalko et al., 2003), en monos japoneses (Uchida et al., 2002) y en humanos (Volke et al., 2002; 2005). Dichos estudios han demostrado que el BPA se absorbe en el enterocito, donde rápidamente es metabolizado y transportado al torrente sanguíneo. Las concentraciones circulantes en sangre posterior a una dosis

oral alcanzan los valores máximos a los 12 minutos de su administración y su vida media alcanza aproximadamente 21 horas (después de una dosis oral de 10mg/kg en ratas) (Yoo et al., 2000).

La mayor parte de los estudios descritos con respecto al metabolismo de BPA se han realizado en ratas. No obstante, es importante mencionar que existen diferencias claras importantes en cuanto el proceso metabólico del BPA en primates con respecto a la rata (European Commission, 2002; 2006). El proceso metabólico de BPA es más rápido en ratas que en primates: aplicando dosis iguales en ambos organismos es posible detectar concentraciones circulantes de BPA en primates 3 horas después de la exposición mientras que en rata son indetectables. Esta diferencia se establece en base a la alta tasa metabólica que tienen las ratas en el llamado metabolismo de primer paso (conjugación del compuesto libre) que es realizado por los enterocitos y los hepatocitos.

### **Absorción**

La absorción gastrointestinal posterior a la ingesta oral se considera la forma más importante de exposición en la especie humana. Se ha descrito que la concentración máxima de BPA-glucoronido en plasma humano se alcanza entre una hora y cuatro horas después de la ingesta oral (Volke et al., 2002). Es importante señalar, que después de este período no es posible la detección de formas libres del BPA y que el 100 % de una dosis oral de entre 60 y 80 µg/kg se puede eliminar a través de la orina (Volke et al., 2002). En la actualidad, existe una gran controversia con respecto a estos informes (Vanderberg et al., 2007, 2008, 2009), sin embargo la EFSA tiene como referencia los resultados descritos por Volke et al., (2002; 2005).

### **Distribución**

Se considera que el 95% del BPA en el ser humano se encuentra unido a proteínas plasmáticas en su forma conjugada. Experimentos realizados *in vitro* indican que el compuesto tiene la capacidad de unirse a la proteína plasmática humana de unión a hormonas sexuales (*human plasma sex hormone-binding protein*) (Dechaud et al., 1999). Esta unión específica es evidente cuando las concentraciones de BPA se encuentran en valores entre  $10^{-4}$ M y  $10^{-5}$ M. Aun cuando la unión del BPA a la proteína se considera específica, no existen evidencias de que el compuesto desplace de los sitios de unión a hormonas previamente unidas a la misma proteína (Heringa et al., 2004).

### **Eliminación**

En la especie humana la vía de eliminación más importante es la renal, tal y como se ha demostrado en estudios realizados en voluntarios sanos (Volke et al., 2002, 2005). En estos individuos se administró 60-80µg/kg del compuesto y se observó la eliminación de la forma

glucoronizada del compuesto en orina con un pico máximo de eliminación a las 6 horas seguido de otro a las 34 horas. El 100% del compuesto se elimina a las 96 horas de su ingestión (Volke et al., 2005).

### **1.3.7. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL BPA.**

El BPA se considera un disruptor hormonal, pero sus mecanismos de acción pueden ser divididos en aquellos causados como agente tóxico (mediados por mecanismos no dependientes de receptores hormonales) y aquellos causados por su actividad como disruptor hormonal (mediados por receptores hormonales). A continuación se describen los mecanismos de acción mediados por ambas vías.

#### **Mecanismos de acción no dependientes de receptores hormonales (cito-toxicidad)**

Los datos clínicos de la toxicidad aguda de BPA que se han observado en ratas empleando dosis de 2000mg/kg son: letargo, postración, pilo-erección, contractura muscular abdominal y muerte (UE, 2003). Las ratas que fueron tratadas con esta dosis y que fallecieron presentaron como posible mecanismo de muerte, vasoconstricción hepática, infarto hepático y hemorragia gastrointestinal. Además de estas alteraciones que se observaron a nivel de sistema digestivo las ratas presentaron inflamación aguda de epitelio nasal, ulceración de región oronasal y edema agudo de pulmón. Los estudios toxicológicos realizados en ratas han determinado que la dosis máxima tolerada de BPA es de 1000mg/kg/día (Le et al., 2008). La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de América (EPA, *Environmental Protection Agency*) estableció la dosis de referencia en 50µg/kg/día utilizando un factor de seguridad de 1000 en relación al LOAEL (*Lowest-Observable-Adverse-Effect Level*). El factor de seguridad se aplica de acuerdo a los estudios realizados en humanos, la variabilidad entre las diferentes poblaciones humanas y finalmente la extrapolación de resultados en animales con respecto a la exposición tanto sub-crónica como crónica. En el humano por tanto, no se ha establecido un valor de toxicidad en cuanto a letalidad pero si un valor máximo de consumo diario. Este valor es de 0.05mg/Kg de peso por día (EFSA) y de 0.06mg/Kg de peso por día (EPA).

#### **Actividad mediada por receptores hormonales**

La primera descripción acerca de la capacidad del BPA de actuar como estrógeno es atribuida a Dodds y Lawson (1936); dichos autores demostraron la actividad estrogénica al mantener el periodo estrol de la rata durante 40 días después de administrarles BPA diariamente. La estrogénicidad del BPA ha sido evaluada utilizando métodos tanto en *in vivo* como en *in vitro*, comparando su actividad con 17β estradiol, etinil estradiol, dietil-estil-bestrol (DES) y estrona.

El método más comúnmente empleado para evaluar la potencia del BPA han sido los ensayos del tipo dosis-respuesta. Este tipo de ensayos se han realizado con el objetivo de evaluar el efecto máximo del BPA mediante la elevación de su concentración hasta obtener su efecto máximo. Los resultados que han sido descritos, se han comparado con los observados con dosis equimolares de estrógenos naturales. De esta manera se ha descrito que la actividad del BPA mediada por estrógenos es 1000 veces menos potente que la inducida por el estradiol (Vicacqua et al., 2003). De la misma manera que otras características del BPA, esta premisa se encuentra actualmente en discusión debido a los reportes en los cuales se observa una actividad equimolar entre el estradiol y el BPA (revisión de Vanderberg et al., 2009).

En la actualidad, se han descrito diversos receptores estrogénicos de membrana, incluyendo al mER $\alpha$  así como el receptor tras-membranal de ER llamado GPR30 (*G protein-coupled receptor 30*) los cuales guardan un gran homología con el receptor nuclear (Powell et al., 2001; Thomas and Dong, 2006; Watson et al., 2007). Los receptores GRP30 poseen la capacidad de regular de manera positiva la adenilciclase y la MAP-quinasa a través de la activación de proteínas G, siendo de esta manera el primer receptor no estrogénico activado por BPA (Thomas and Dong 2006). Por tanto, se considera que el BPA tiene la capacidad de unirse a ambos receptores (mER $\alpha$  y GPR30) y de esta manera activar acciones esteroideas de tipo no genómico (Poweel et al., 2001; Watson et al., 2005; 2007). Las acciones mediadas por estos receptores, responden a niveles nano y picomolares de BPA (Alonso-Magdalena et al., 2005; Watson et al., 2007; Noguchi et al., 2008).

Los mecanismos de acción del BPA relacionados con receptores nucleares de estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) han demostrado que el compuesto funciona como un ligando de ER $\alpha$  y ER $\beta$ , e induce factores de transcripción ligados a hormonas (Mueller and Korach, 1999). Estudios realizados en ratones en los cuales se ha suprimido la presencia de los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  han demostrado la ausencia de los efectos mediados por BPA (Couse and Korach, 1999; Markey et al., 2001). Estudios posteriores han demostrado que si bien, el mecanismo de acción primordial del BPA es mediado mediante receptores nucleares de estrógenos existen otras vías por las cuales el compuesto puede ejercer su actividad. En este sentido, el BPA se ha asociado a la activación de receptores relacionados a estrógenos (ERRs), estructuralmente muy parecidos a ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Horard and Vanacker, 2003). Existen 3 subfamilias de estos receptores, ERR $\alpha$ , ERR $\beta$  y ERR $\gamma$  (Hong et al., 1999), aun cuando su homología con ER $\alpha$  y ER $\beta$  es alta, tienen la peculiaridad de no ser activados por estrógenos naturales (Huppunen y Aarnisalo, 2004). Los ERRs no cuentan con un ligando natural demostrable, pero compuestos sintéticos como el DES suprimen su actividad transcripcional. En el caso específico del BPA debido a su forma compacta y de mínima energía se une al ERR $\gamma$  bloqueándolo y manteniéndolo activo (Takayanagi et al., 2006).

Finalmente, además de la actividad del BPA mediada por receptores de estrógenos se ha descrito que el BPA tiene la capacidad de unirse a receptores de hormonas tiroideas, actuando como un antagonista de la tri-iodo-tironina (T3) (Kitamura et al., 2002).

### **1.3.8. EFECTOS DEL BPA EN HUMANOS.**

En la literatura científica existe un gran número de estudios con respecto a los efectos del BPA sobre todo en animales. En relación a los efectos en humanos, las discrepancias entre los diferentes autores hacen aún más difícil la comprensión y estudio de los efectos del BPA. A continuación, se describen de manera breve los estudios más significativos en relación a la metodología empleada.

#### **Estudios de tipo clínico y reportes de casos**

Se han descrito diversos estudios sobre los efectos del BPA, pero sin duda uno de los más importantes es el de Goubing et al. (2005). Estos autores examinaron las concentraciones plasmáticas circulantes de BPA en un grupo de 33 trabajadores de una fábrica de resinas epoxy. Las concentraciones plasmáticas fueron desde 5.3µg/l hasta 323µg/l dependiendo del área de trabajo. Los controles analizados presentaron valores de 0.39 µg/l hasta 31.2 µg/l. La evaluación clínica de los individuos expuestos así como la de los controles no fue significativamente diferente. Los perfiles hormonales de ambos grupos, solo demostraron un incremento en FSH en el grupo de trabajadores sin que este fuera significativo.

Yang et al. (2006), utilizando cuestionarios para evaluar la ocupación, salud reproductiva (número de hijos, abortos, etc.), hábitos alimenticios (uso de microondas, recipientes de plástico, comida enlatada, etc.) seleccionó un grupo de jóvenes coreanos sin antecedente de exposición ocupacional al compuesto, y determinó los valores de BPA en orina (tanto libre como conjugado). Los autores no encontraron asociación entre las concentraciones urinarias de BPA y los datos obtenidos mediante el cuestionario. Posteriores estudios en mujeres del sur de España, han demostrado que no existe diferencia demográfica-social en relación a la concentración de BPA plasmático (Mariscal-Arcas et al., 2009).

#### **Estudios epidemiológicos**

Debido a que el BPA se ha relacionado con diversos efectos en el ser humano, en este apartado solo se mencionan aquellos que se encuentran ligados de manera más directa al proceso reproductivo. Estudios realizados en mujeres en edad reproductiva han demostrado que las concentraciones plasmáticas de BPA son más elevadas que en las mujeres con historia de aborto de repetición (2.6ng/ml) que en mujeres sanas (0.77ng/ml) (Sugiura-Ogasawara et al., 2005). Finalmente, estudios realizados en abortos espontáneos parecen demostrar que los productos de

madres con valores altos de BPA en sangre presentan un incremento en el número de alteraciones cromosómicas de tipo numérico (Sugiura-Ogasawara et al., 2005).

### 1.3.9. EFECTOS REPRODUCTIVOS.

Los efectos de BPA a nivel reproductivo han sido estudiados fundamentalmente en animales de laboratorio así como en peces expuestos a caudales de ríos contaminados por BPA. Los trastornos reproductivos provocados por BPA se relacionan con una alteración en la tasa de crecimiento y maduración sexual temprana, alteración de los niveles de hormonales circulantes, respuesta inmune anómala, disminución en la tasa de fertilidad, patrones irregulares en la bioquímica cerebral y comportamiento, defectos en la estructuración del cito-esqueleto, aneuploidias y modificación en los fenómenos de *imprinting*. Debido a la gran cantidad de artículos publicados, a continuación se mencionan algunos de los más representativos en relación a efectos reproductivos.

- Incremento en el crecimiento postnatal (Nikaido et al., 2004): los ratones que han sido expuestos al BPA durante su gestación presentaron un incremento en el índice de masa corporal a expensas de tejido adiposo. Estudios recientes en humanos han demostrado que la exposición al BPA provoca un incremento en el riesgo de dislipidemias, obesidad y diabetes (Takeuchi et al., 2002, 2006; Sugiura-Ogasawara et al., 2005; Yang et al., 2006).
- Maduración sexual temprana (Howdeshell et al 1999; Makey et al., 2001; Nikaido et al., 2004): las hembras de rata expuestas *in utero* a dosis entre 2.4 µg/kg/día a 500 µg/kg/día presentaron una maduración sexual temprana de glándulas mamarias y útero.
- Niveles plasmático de hormona luteinizante (LH) anormales y disminución de testosterona circulante (Akingbemi et al., 2004; Hawai et al., 2003): los ratones machos que se expusieron a BPA presentaron una regulación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.
- Aumento en el tamaño prostático en ratas expuestas *in utero* (Gupta et al., 2000; Akingbemi et al., 2004; Tims et al., 2005; Ho et al., 2006): las ratas que se expusieron a BPA durante la gestación presentaron un incremento en el riesgo de hipertrofia prostática y de cáncer de próstata.
- Disminución de la concentración de enzimas antioxidantes (Chitra et al., 2003) y alteración en la actividad de uridina difosfato y glucoroniltransferasas de microsomas hepáticos en ratas (Takeyoshi et al., 2002): los ratones expuestos a BPA durante la gestación presentaron tasas de actividad enzimática menores que las de los ratones no expuestos. El efecto negativo del BPA en sistemas enzimáticos de este



tipo no se encuentra directamente ligado al proceso reproductivo, pero se considera importante ya que una alteración en el metabolismo enzimático se relaciona con un aumento en las concentraciones circulantes de BPA.

- Incremento de receptores de la progesterona a nivel cerebral (Funabashi et al., 2003) e hiperactividad con pobre control de estímulos y conducta agresiva (Adriani et al., 2003; Suzuki et al 2003): los ratones que se han expuestos *in utero* al BPA, presentan alteraciones neuro-conductuales. Las alteraciones neuro-conductuales se relacionan a agresividad y ciclos reproductivos anormales (Hong et al., 2006).
- Aneuploidias y aborto temprano en ratones expuestos *in utero* (Hunt et al., 2003). Este efecto se describe de manera más extensa en el apartado 1.3.10.
- Retraso en el ciclo celular debido a la alteración en centrómeros y organización de el huso de microtúbulos en ovocitos humanos (Can et al., 2005) e inhibición de crecimiento por alteración en microtúbulos de fibroblastos humanos (Lehmann and Metzler, 2004): Los ovocitos provenientes de tejido ovárico adulto mostraron desestructuración de los microtúbulos que conllevó a la alteración en la formación del huso meiótico y a la extrusión de material cromosómico debido a un proceso de segregación disfuncional. La alteración en la segregación provocó la presencia de errores numéricos en los ovocitos generados.
- *Imprinting* genómico de genes *Hoxa 10* (Smith y Taylor 2006): ratones expuestos a BPA durante la gestación presentan una tasa elevada de *imprinting* con respecto a los ratones no expuestos. Los genes *Hoxa 10*, se han relacionado con el desarrollo uterino así como del estroma ovárico.

### **1.3.10. EFECTOS DEL BPA EN LA PRIMERA PROFASE MEIÓTICA.**

Sin duda todos los efectos descritos en el apartado 1.3.9., pueden alterar el proceso reproductivo, pero ¿Cuáles son los efectos del BPA durante la meiosis? Los efectos del BPA en la primera profase han sido estudiados por un grupo muy reducido de investigadores. De hecho, solo se han publicado dos trabajos que muestran el efecto de BPA en ovocitos de ratón (Hunt et al., 2003; Susiarjo et al., 2007) y otro estudio que muestra los efectos en *C. elegans* (Allard y Colaiácovo, 2010). A continuación se describen los resultados publicados por estos investigadores.

Los primeros estudios publicados por el grupo de Hunt et al., (2003) demostraron un incremento en la tasa de aneuploidias y abortos tempranos en ratas expuestas de manera accidental a BPA. Posteriormente a la exposición accidental, los autores evaluaron los efectos del BPA al exponer a ratones a dosis orales de entre 20ng/g y 100ng/g. Los autores observaron que los ovocitos de animales expuestos a BPA presentaron un incremento del 40% en los errores

apareamiento y sinapsis así como un incremento del 5.8% en las anomalías numéricas de los ovocitos (hiperploides).

Las observaciones realizadas en el primer estudio de Hunt et al. (2003) desembocaron en la realización de un segundo trabajo del mismo grupo (Susiarjo et al., 2007). En este trabajo se estudió el efecto del BPA en animales expuestos a BPA mediante la evaluación del apareamiento y sinapsis así como la recombinación. Los errores de apareamiento y sinapsis del tipo uniones *end-to-end* se incrementaron en un 25.6% en los ovocitos expuestos a BPA. Por otro lado, los autores describieron un incremento del 8.9% en el número de puntos de recombinación (detectados mediante la proteína MLH1) en ovocitos expuestos a BPA, así como un incremento en los quiasmas. En este mismo estudio, empleando animales modificados genéticamente para evitar la expresión del ER $\beta$  describieron que los animales presentaban las mismas alteraciones observadas en aquellos que habían sido tratados con BPA. En este sentido, los autores concluyeron que el efecto del BPA en ovocitos se relaciona con efecto antiestrógeno del compuesto sobre los receptores  $\beta$ .

Recientemente, Allard y Colaiácovo (2010) han descrito el efecto del BPA sobre el proceso de gametogénesis en *C. elegans*. Los autores observaron una disminución en la viabilidad de los ovocitos, retraso y acumulación de los ovocitos en etapas tempranas de la profase, tasas altas de aneuploidías e infertilidad. Por otro lado estos autores describieron una alteración en la actividad de la proteína RAD51 implicada en la reparación de las rupturas de doble cadena. Finalmente estos autores al igual que Susiarjo et al., (2007) concluyeron que el efecto observado en los ovocitos podría estar mediado por un efecto anti-estrógeno del BPA mediado a su vez por el bloqueo de la actividad de receptores de tipo  $\beta$ .

## 2. Objetivos



## 2. OBJETIVOS.

El BPA es un compuesto que se produce y se emplea anualmente en grandes cantidades. Debido a su amplio uso en la producción de artículos empleados en alimentación, juguetes, odontología y biberones, se considera que es un compuesto al cual estamos expuestos de manera continuada.

Estudios realizados en los Estados Unidos de Norte América han demostrado que el 90% de los adultos tienen valores detectables de este compuesto en sangre y orina. Las mujeres embarazadas así como los neonatos son un grupo particular de estudio ya que en ellos se duplican los valores descritos en adultos tanto en sangre como en orina. En este sentido, es importante señalar que los productos "derivados de la gestación" (líquido amniótico, placenta y leche materna) pueden presentar valores hasta 10 veces más altos.

Los efectos del BPA como disruptor hormonal se han estudiado en diferentes modelos de animales así como en cultivos de líneas celulares tanto de humanos como de animales. Sin embargo, los efectos a nivel reproductivo siguen siendo un punto de debate dentro de la comunidad científica. Se ha demostrado que el BPA produce alteraciones en la estructura y función de los ovocitos provenientes de tejido ovárico adulto pero en el caso específico de ovocitos fetales, solo existen unos pocos reportes sobre sus efectos. De hecho los estudios realizados para evaluar los efectos del BPA en ovocitos en profase I han demostrado que tanto en *C. elegans* como en ratón, este producto afecta el correcto desarrollo de los procesos de apareamiento, sinapsis y recombinación, con las consecuencias que, de ellos, puedan derivarse en las células germinales resultantes.

En este sentido, si en animales de experimentación existe poca información, en ovocitos fetales humanos es inexistente. Las características de la gametogénesis femenina en mamíferos incluyendo al humano, en la cual el proceso reproductivo se inicia durante la vida fetal han limitado aún más su estudio. Durante este período se desarrollan diferentes procesos celulares, y sin duda la primera profase meiótica es uno de los más importantes. El correcto desarrollo de los eventos de apareamiento, sinapsis y recombinación durante la profase I permite que durante la edad reproductiva se tengan ovocitos con las características necesarias para ser aptos en el proceso reproductivo. La alteración de estos procesos se relaciona con anomalías en la segregación, aneuploidías y en general con trastornos en la vida reproductiva de la mujer.

De esta manera el objetivo de este trabajo es valorar los efectos del BPA sobre los procesos de apareamiento, sinapsis y recombinación en el ovocito fetal humano expuesto al BPA tanto a nivel citogenético como a nivel de expresión génica.

De esta manera, los objetivos planteados durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral han sido:

**Objetivo general:**

Determinar los efectos tóxicos del BPA en ovocitos fetales humanos cultivados *in vitro*.

**Objetivos específicos:**

1. Desarrollar un modelo de cultivo *in vitro* que permita:
  - la progresión meiótica de los ovocitos fetales humanos *in vitro*.
  - la recombinación meiótica de los ovocitos fetales humanos *in vitro*.
  
2. Evaluar el efecto del BPA en ovocitos fetales humanos cultivados *in vitro*, con respecto a:
  - la progresión meiótica de los ovocitos fetales humanos *in vitro*.
  - la recombinación meiótica de los ovocitos fetales humanos *in vitro*.
  
3. Evaluar la expresión génica de los ovocitos fetales humanos *in vitro* en:
  - Ovocitos fetales humanos en cultivo no expuestos a BPA.
  - Ovocitos fetales humanos en cultivo expuestos a BPA.

### 3. Material y Métodos





### **3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Tal y como se ha mencionado, durante la vida fetal los ovocitos humanos progresan a través de la meiosis. Para la realización de este trabajo de tesis, se han empleado 27 fetos euploides obtenidos del Banco de Tejidos Fetales del Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona, previa aceptación del proyecto por parte del comité de ética del hospital. De los 27 casos utilizados, 11 se emplearon para la realización de los protocolos previos a la estandarización de las técnicas (estos casos no se muestran) y 16 para la obtención de resultados que se muestran posteriormente.

#### **3.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.**

Con el objetivo de tener el máximo control en relación a la calidad, homogeneidad y manejo de las muestras, se establecieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

##### **Criterios de inclusión**

- Fetos euploides.
- Edad gestacional de 18 a 22 semanas (fecha de última menstruación, medida plantar y ultrasonido obstétrico).
- Período máximo transcurrido de 2h desde la realización del evento obstétrico hasta el inicio de protocolo de cultivo.
- Carta de consentimiento informado firmada por los progenitores.

##### **Criterios de exclusión**

- Fetos con cariotipo anormal (trisomías, monosomías, etc.).
- Edad gestacional menor a 18 SDG o mayor a 22 SDG.
- Período postaborto mayor a 2 h.
- Falta de carta de consentimiento informado.

#### **3.1.2. CASOS EMPLEADOS.**

Como fue mencionado en el apartado 3.1., las muestras biológicas se han obtenido del Banco de Tejidos Fetales del Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona. A continuación en la tabla 3.1 se muestran los casos que han sido empleados para la realización de este trabajo de tesis. Los bloques de color indican los casos empleados para realizar cada uno de los objetivos específicos. En el pie de la tabla 3.1 se muestra la relación de los colores con respecto a los objetivos.

**Tabla 3.1.** Casos empleados para la realización de los objetivos específicos.

Caso	Edad gestacional	Longitud de pie (cm)	Peso (gr)	Diagnóstico	Cariotipo
V133	18	3.3	495	Acrania	46,XX
V140	21	3.2	440	Cardiopatía	46,XX
V143	21	3.5	490	Malformación renal	46,XX
V144	20	3.1	425	Anencefalia	46,XX
V151	18	3.3	445	Acrania	46,XX
V153	21	3.7	490	Cardiopatía	46,XX
V154	20	3.1	280	Defecto tubo neural	46,XX
V155	21	3.6	462	Anencefalia	46,XX
V156	21	4.1	480	Defecto tubo neural	46,XX
V158	21	3.5	500	Razón social	46,XX
V160	22	3.7	450	Agnesia vérmix	46,XX
V175	22	4.5	687	Malformación renal	46,XX
V176	21	3.4	380	Hipoplasia nasal	46,XX
V178	22	4.1	509	Agnesia de c. calloso	46,XX
V181	21	4.0	500	Adenomatosis	46,XX
V183	21	3.9	475	Hernia diafragmática	46,XX

- Casos que se emplearon para el desarrollo del modelo de cultivo *in vitro*.
- Casos que se emplearon para evaluar el efecto del BPA en ovocitos fetales humanos cultivados *in vitro*.
- Casos que se emplearon para evaluar la expresión génica de los ovocitos fetales humanos *in vitro*.

### 3.1.3. MANEJO INICIAL DEL MATERIAL Y TRANSPORTE DEL TEJIDO.

Las muestras que cumplen los criterios de inclusión se manejan de la siguiente manera:

#### Pasos que se realizan en el banco de tejidos:

- Los ovarios recolectados se lavan en 4 ocasiones consecutivas con buffer PBS. Cada lavado se realiza durante 30 segundos. El objetivo de los lavados es retirar la mayor cantidad posible de células hemáticas.
- Los ovarios se transportan al laboratorio en medio de cultivo D-MEM (*Dulbecco's minimal essential medium*). El medio de cultivo que se utiliza para el transporte se suplementa con penicilina 100UI/ml y estreptomycinina 50µg/ml. La temperatura durante todo el proceso de transporte se mantiene a 4°C.

#### Pasos que se realizan en el laboratorio:

Bajo campana de flujo laminar se realizan los siguientes pasos para diseccionar el tejido:

- Se realizan 4 lavados de 30 segundos cada uno con solución PBS.
- Se coloca el tejido ovárico en una caja de Petri estéril.

- Se retiran los anexos (trompas de Falopio) del resto de tejido ovárico por medio de la visualización con el microscopio estereoscópico.
- Se corta cada uno de los ovarios en cuatro trozos. Los trozos de ambos ovarios se colocan en una caja de Petri y se mezclan. De los 8 trozos, se toman al azar 2 trozos para cada método de disgregación.

### **Material y equipo**

- Medio de cultivo D-MEM (Gibco)
- PBS (Sigma)
- Cajas de Petri (Nunc)
- Tubos cónicos de 10ml (Nunc)
- Penicilina (Sigma)
- Estreptomicina (Sigma)
- Campana de flujo laminar

### **3.1.4. MÉTODOS DE DISGREGACIÓN EMPLEADOS.**

Con el objetivo de evaluar el tipo de disgregación más apto para el cultivo de ovocitos fetales humanos, en este trabajo de tesis se han analizado cuatro diferentes métodos de disgregación. Los métodos se dividen en: métodos enzimáticos (colagenasa IV + hialuronidasa V y Tripsina) y métodos mecánicos (punción y fragmentos ováricos). Las metodologías que se aplican en cada uno de ellas se describen a continuación.

#### **Métodos enzimáticos**

Método de Colagenasa IV + Hialuronidasa V

- Se toman 2 trozos de ovario (ver apartado 3.1.3., pasos que se realizan en el laboratorio) y se cortan mecánicamente mediante la utilización de un *tissue chopper* en fragmentos de 1mm x 1mm x 1mm aproximadamente.
- Los fragmentos se colocan en 5ml de solución de hialuronidasa tipo V (0.01%) y colagenasa IV (0.1%) (ambos de Sigma Aldrich). Se incuba la solución con los fragmentos durante una hora a una temperatura de 37°C.
- Al terminar el período de incubación, se bloquea la actividad enzimática agregando 15ml de medio de cultivo D-MEM (Gibco). El medio de cultivo se calienta previamente a una temperatura de 37°C.
- La suspensión se centrifuga durante 10 minutos a 600g.
- Se retira el medio de cultivo por decantación.

- El botón celular (*pellet*) se resuspende en 1.5ml de medio de cultivo y se pipetea 0.5ml de la suspensión en 3 diferentes cajas de Petri, correspondientes a los tiempos de estudio. Se les agrega 0.5ml de medio para completar 1ml por caja.

#### Método de Tripsina

- Se toman 2 trozos de ovario (ver apartado 3.1.3., pasos que se realizan en el laboratorio) y se cortan mecánicamente mediante la utilización de un *tissue chopper* en fragmentos de 1mm x 1mm x 1mm aproximadamente.
- Se coloca el tejido en 5ml de tripsina (0.25%) (Sigma Aldrich) y se pone en agitación durante 30 minutos a una temperatura de 37°C.
- Al terminar el período de incubación, se bloquea la reacción enzimática, agregando 15ml de medio de cultivo D-MEM (Gibco) previamente calentado a 37°C.
- La suspensión se centrifuga durante 10 minutos a 600g.
- Se retira el medio de cultivo por decantación.
- El botón celular se resuspende en 1.5ml de medio de cultivo y se coloca 0.5ml de la suspensión en 3 diferentes cajas de Petri, correspondientes a los tiempos de estudio. Se les agrega 0.5ml de medio para completar 1ml por caja.

### Métodos mecánicos

#### Método por Punción

- Se toman 2 trozos de ovario (ver apartado 3.1.3., pasos que se realizan en el laboratorio) y se cortan mecánicamente mediante la utilización de un *tissue chopper* en fragmentos de 1mm x 1mm x 1mm aproximadamente.
- Los trozos ováricos se puncionan con aguja entomológica mediante el uso de un microscopio estereoscópico (Wild Heerbrugg). Se agregan 100µl de solución PBS y se retira la solución con el producto de la punción y se coloca en un tubo cónico estéril. Estos procedimientos se repiten 4 veces.
- Los restos de los fragmentos ováricos se trituran con el bisturí hasta obtener un material homogéneo el cual se agrega al tubo cónico.
- La solución se centrifuga a 600g durante 10 minutos.
- Se resuspende la botón celular en 1.5ml de medio de cultivo y se pipetea 0.5ml de la suspensión en 3 diferentes cajas de Petri, correspondientes a los tiempos de estudio. Se les agrega 0.5ml de medio para completar 1ml por caja.

#### Método de Fragmentos ováricos

- Se toman 2 trozos de ovario (ver apartado 3.1.3., pasos que se realizan en el laboratorio) y se cortan mecánicamente mediante la utilización de un *tissue chopper*, en fragmentos de 1mm x 1mm x 1mm aproximadamente.

- Los fragmentos se resuspenden en 0.5ml de medio de cultivo y se colocan 5 fragmentos de ovario en cada tubo cónico estéril de 10ml.
- Se agregan 4.5ml de medio de cultivo, de este modo al colocar el tubo a 30° se mantienen los fragmentos de tejido cubiertos el medio de cultivo.

### **Material y equipo**

- Tripsina (Sigma)
- Colagenasa IV (Sigma)
- Hialuronidasa V(Sigma)
- Medio de Cultivo D-MEM (Gibco)
- PBS (Sigma)
- Tubos cónicos 10ml (Nunc)
- Cajas de Petri (Nunc)
- Vidrio de Reloj
- Bisturí
- Hojas de bisturí
- Pinzas de disección
- Microscopio estereoscópico (Wild Heerbrugg)
- Baño de agitación termo-regulable
- Estufa de incubación
- Centrífuga (Sharlab)

### **3.1.5. MÉTODOS DE SIEMBRA.**

La siembra de los ovocitos que se disgregan siguiendo los métodos indicados en el apartado 3.1.3., se realiza de dos maneras diferentes. Los ovocitos que se obtienen de los métodos de disgregación enzimáticos así como los que se obtienen mediante punción se siembran en cajas de Petri de 2,5cm<sup>2</sup> de superficie. Los ovocitos que se obtienen mediante el método de disgregación de fragmentos ováricos se siembran en suspensión mediante la utilización de tubos cónicos de 10ml. A continuación se describe la metodología empleada para cada una de las dos opciones posibles.

#### **Cultivo en caja de Petri de 2,5cm<sup>2</sup>**

- Se resuspenden los ovocitos y se colocan en una caja de Petri de 2,5cm<sup>2</sup> de diámetro, estériles y tratada previamente con poli-D-lisina, 0.1mg/ml (Sigma Aldrich) y se coloca en incubadora a una temperatura de 37°C y una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

- Se realiza cambio de medio de cultivo cada tercer día después de la siembra. Este proceso de cambio de medio es parcial, es decir de los 1.5ml de medio que se colocan inicialmente se extrae 1ml y se reemplaza con 1ml medio de cultivo fresco.
- El cultivo se monitoriza de manera diaria para evaluar su evolución y vigilar sus condiciones de esterilidad.
- Para cada una de las muestras, se realiza un cultivo por triplicado.

### **Cultivo en suspensión**

- Se resuspende el botón celular (*pellet*) en medio de cultivo previamente calentado a una temperatura de 37°C y se coloca en un tubo cónico de 10ml estéril, posteriormente se lleva a incubadora a una temperatura de 37°C y una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
- Se monitoriza el cultivo de manera diaria para evaluar su evolución y vigilar sus condiciones de esterilidad.
- Para cada una de las muestras, se realiza un cultivo por triplicado.

### **Material y equipo**

- Cajas de Petri de 2,5cm<sup>2</sup> (Nunc)
- Tubos cónicos 10ml (Nunc)
- Agua tridestilada desionizada (MiliQ)
- Medio de cultivo D-MEM (Gibco)
- Poli-D-lisina (Sigma Aldrich)
- Puntas de micropipetas (Finntip)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Incubadora

#### **3.1.6. MEDIOS DE CULTIVO.**

Los medios de cultivo que se emplean para realizar el cultivo de ovocitos fetales varían de acuerdo a los suplementos que contienen. Se dividen en medio de cultivo control y medio de cultivo enriquecido con SCF. A continuación se detalla la composición de cada uno de ellos.

#### **Medio de cultivo control**

El medio de cultivo control contiene: Medio DMEM básico suplementado con insulina 5µg/ml, transferrina 5µg/ml, selenio 5ng/ml (todos ellos de Gibco), penicilina 100UI/ml y estreptomycin 100µg/ml (ambos de Invitrogen).

### **Medio suplementado con SCF**

El medio de cultivo suplementado contiene: Medio DMEM básico suplementado con insulina 5µg/ml, transferrina 5µg/ml, selenio 5ng/ml (todos ellos de Gibco), penicilina 100UI/ml estreptomina 100µg/ml (ambos de Invitrogen) y 100ng/ml de SCF (Sigma Aldrich).

### **Material y equipo**

- Agua tridestilada desionizada (MiliQ)
- Medio de cultivo D-MEM (Gibco)
- SCF (Sigma Aldrich)
- ITS (insulina, transferrina y selenio) (Gibco)
- Penicilina (Invitrogen)
- Estreptomina (Invitrogen)
- Puntas de micropipetas (Finntip)
- Micropipetas (Eppendorf)

### **3.1.7. PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL CULTIVO.**

El proceso de desprendimiento y separación celular se realiza siguiendo la metodología que se menciona a continuación.

- El total del medio de cultivo se retira por medio de decantación.
- Se lava la caja de Petri con 3ml de solución PBS previamente calentada a una temperatura de 37°C (solución libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>).
- Se retira la solución PBS por decantación.
- Se añaden 3ml de tripsina 0.25% precalentada a una temperatura de 37°C y se coloca en incubadora durante 1 minuto.
- Se bloquea la reacción enzimática agregando 9ml de medio D-MEM previamente calentado a una temperatura de 37°C.
- Se toma el medio con los ovocitos en suspensión y coloca en un tubo cónico de 10 ml para su centrifugación.
- Se centrifuga durante 10 minutos a 600g.
- Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón celular (pellet) en 1ml de solución PBS.
- La suspensión se emplea para el proceso de extensión de la muestra y fijación (apartado 3.1.8.).

### **Material y equipo**

- Tubos cónicos 10ml

- PBS (Sigma Aldrich)
- Tripsina (Sigma Aldrich)
- Medio de cultivo a-MEM (Gibco)
- Citocentrífuga
- Estufa (Sharlab)

### **3.1.8. TIEMPOS DE ANÁLISIS.**

Con el objetivo de evaluar la progresión meiótica a lo largo de los días de cultivo, se establecieron cuatro diferentes tiempos de análisis. A continuación se describen las características de cada uno de ellos.

#### **Tiempo 0 (T0)**

El tiempo cero T0 corresponde al análisis de los ovocitos previo a su cultivo y posterior al proceso de disgregación.

#### **Tiempo 7 (T7)**

El tiempo 7 (T7) corresponde al análisis de los ovocitos después de 7 días de cultivo. El análisis a los 7 días de cultivo se realiza para cada uno de los métodos de disgregación y medio de cultivo descritos en los apartados 3.1.4. y 3.1.5.

#### **Tiempo 14 (T14)**

El tiempo 14 (T14) corresponde al análisis de los ovocitos después de 14 días de cultivo. El análisis a los 14 días de cultivo se realiza para cada uno de los métodos de disgregación y medio de cultivo ya descritos en los apartados 3.1.4. y 3.1.5.

#### **Tiempo 21 (T21)**

El tiempo 21 (T21) corresponde al análisis de los ovocitos después de 21 días de cultivo. El análisis a los 21 días de cultivo se realiza para cada uno de los métodos de disgregación y medio de cultivo ya descritos en los apartados 3.1.4. y 3.1.5.

### **3.1.9. EXTENSIÓN Y FIJACIÓN DE OVOCITOS.**

La suspensión de ovocitos obtenida posterior al proceso de desprendimiento (apartado 3.1.6.) se extiende en portaobjetos y se fija para su posterior análisis citogenético. A continuación se describe la metodología que se utiliza para la realización de la extensión y fijación de ovocitos tanto cultivados (T7, T14 Y T21) como para ovocitos en T0.

- Se resuspende el botón celular obtenido del proceso de desprendimiento del cultivo (apartado 3.1.7) en 1ml de solución PBS.
- Se pipetea dentro del complejo de cito-centrifugación (portaobjetos montado en el soporte de la cámara de citocentrifugación) 0.5ml de solución de sacarosa 0.02M.
- Se pipetea 20µl de la suspensión celular.



- Se centrifuga 15 minutos a 115g.
- Se retira el portaobjetos del complejo de cito-centrifugación y se coloca en una cámara húmeda durante dos horas.
- Se pipetea 0.6ml de la solución de fijación transcurridas 2 horas (formaldehído en solución acuosa al 9%, pH=10.0).
- Se deja fijar la muestra dentro de una cámara durante 24 horas a temperatura ambiente.
- Se lavan los portaobjetos con una solución de 1% PhotoFlo (Kodak). Se realizan 4 lavados de 1 minuto cada uno de ellos.
- Se secan los portaobjetos a temperatura ambiente y posteriormente se realiza el proceso de inmunotinción. Los portaobjetos en los que no se realiza la inmunotinción de manera inmediata, se almacenan a una temperatura de -80°C.

### **Reactivos y equipos**

- Pipetas Pasteur
- Filtros de 22µm (Millipore)
- Tubos cónicos de centrifuga
- Bisturí
- Pinzas de disección
- PBS (Sigma)
- Recipiente estéril de 50 ml
- Vidrio de reloj
- Formaldehído (Fluka)
- PhotoFlo (Kodak)
- Microscopio estereoscópico (Wild Heerbrugg)
- Citocentrífuga (Janetzki)
- Agujas entomológicas
- Criotubos (Nunc)

### **3.1.10. INMUNOTINCIÓN.**

La inmunotinción se realiza haciendo algunas modificaciones a los protocolos descritos por Scherthan et al. (2000) y Roig et al. (2006). Los anticuerpos que se utilizan para la inmunotinción son anticuerpos monoclonales y policlonales de distintas casas comerciales, estos anticuerpos interactúan con las siguientes proteínas humanas: REC8 (sintetizada en conejo y donada por el Dr. Barbero), SYCP3 (sintetizado en conejo) (Abcam), SYCP1 (sintetizado en conejo y/o ratón) (Abcam)

y anticuerpo monoclonal dirigido a MLH1 (sintetizado en ratón) (BD Pharmigen). La metodología aplicada en el proceso se describe a continuación:

- Las extensiones de ovocitos que se han obtenido de los cultivos (apartado 3.1.8) se lavan en agitación con 75ml de agua tridestilada y desionizada (MilliQ) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se retira el agua por decantación y se agrega 75ml solución de bloqueo a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se prepara con: 75ml de buffer PBS, 25 $\mu$ l de Tween 20 (Sigma) y 0.20mg de albumina (Sigma).
- Los portaobjetos se lavan en agitación con la solución de bloqueo. Este paso se repite en 3 ocasiones, cada lavado tiene una duración de 10 minutos.
- Se coloca sobre los portaobjetos la solución con el anticuerpo primario. La solución con el anticuerpo primario está formada por 100 $\mu$ l de solución de bloqueo y el anticuerpo primario. Los volúmenes de anticuerpo primario que se utilizan son los siguientes: 0.5 $\mu$ l de anticuerpo REC8, 0.5 $\mu$ l de anticuerpo SYCP3, 0.5 $\mu$ l de anticuerpo SYCP1 y 1.5 $\mu$ l de anticuerpo MLH1.
- Se incuban los portaobjetos con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C.
- Posteriormente a la incubación, se lavan los portaobjetos durante 15 minutos con la solución de bloqueo. Este paso se repite en 4 ocasiones.
- Se retira la solución de bloqueo mediante decantación.
- La detección de los anticuerpos primarios se hace aplicando un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. Los anticuerpos secundarios que se aplican se encuentran en una solución conformada por: 100 $\mu$ l de solución de bloqueo, 0.5 $\mu$ l de anticuerpo anti-ratón conjugado a Cy3, 0.5 $\mu$ l de anticuerpo anti-ratón conjugado a FITC, 0.5 $\mu$ l de anticuerpo anti-conejo conjugado a Cy5 y 0.5 $\mu$ l de anticuerpo anti-conejo conjugado a Cy3 (todos ellos de Jackson ImmunoResearch). La combinación de anticuerpos secundarios se elige de acuerdo al origen de los anticuerpos primarios.
- Se incuba con la solución que incluye los anticuerpos secundarios durante una hora a una temperatura de 37°C.
- Posteriormente a la incubación con la solución que contiene los anticuerpos secundarios, se realizan 4 lavados con solución de bloqueo. Cada uno de los lavados tiene una duración de 15 minutos y se realizan en agitación.
- Se fija la señal del anticuerpo con una incubación de 10 minutos en una solución de 1% de formaldehído.
- Se lava el portaobjetos en agitación con la solución de bloqueo durante 10 minutos.
- Se aplica 25 $\mu$ l de DAPI (Invitrogen).
- Se coloca el cubre objetos y se lleva a analizar al microscopio.

## Reactivos y equipo

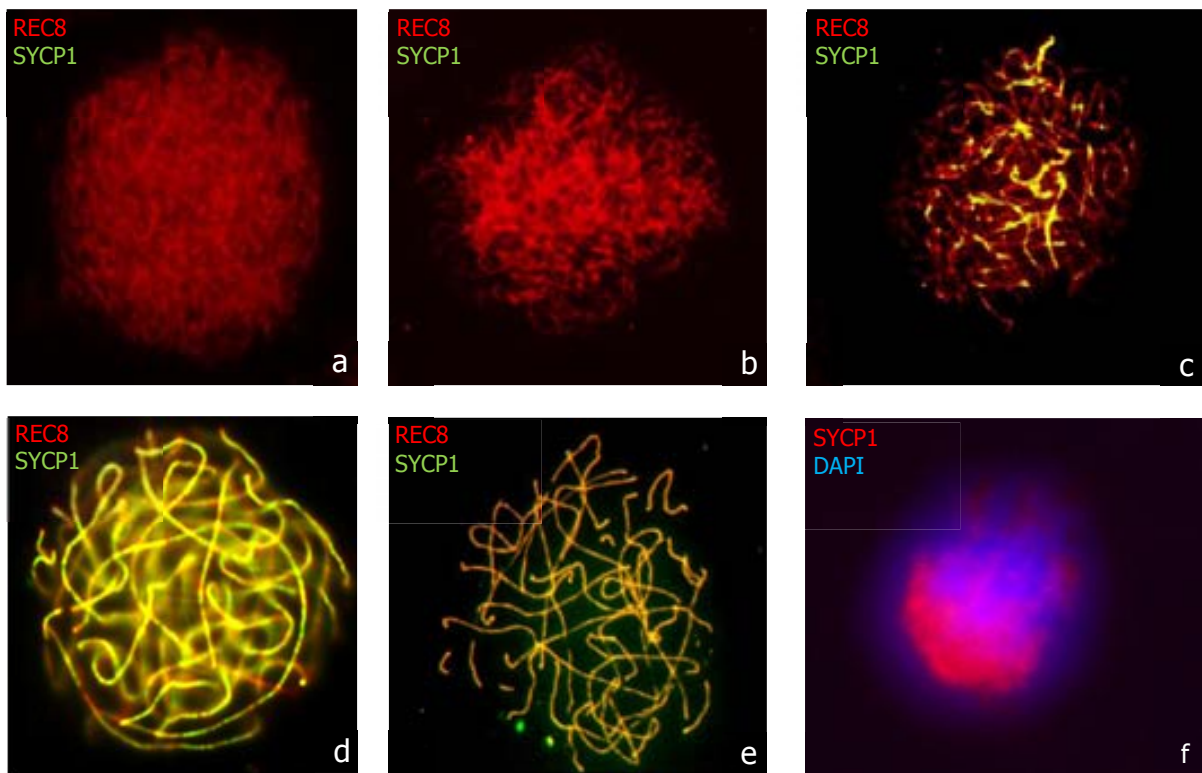
- Tween 20 (Sigma)
- Glicina (Sigma)
- Formaldehído (Merck)
- PBS (Sigma)
- 0.2% BSA (Sigma)
- 0.05% Tween 20 (Sigma)
- Anticuerpos primarios: Anti-REC8 de conejo (1/100) (Anticuerpo cedido por el Dr. J.L. Babero, DIO/CNB, España), Anti-SYCP3 de conejo (1/100) (Abcam), Anti-SYCP1 de conejo (1/100) (Abcam) y Anti-MLH1 de ratón (1/50) (BD Pharmigen).
- Anticuerpos secundarios (todos son de Jackson ImmunoResearch Laboratories) Anti-conejo FITC de cabra (1/100), Anti-conejo Cy3 de cabra (1/100), Anti-ratón FITC de cabra (1/100), Anti-ratón Cy3 de cabra (1/100) y Anti-ratón Cy5 de cabra (1/100).
- DAPI (Sigma)
- Vectashield (Vector)
- Cubreobjetos (Menzel-glaser)
- Parafilm (Pechiney)
- Tubos Eppendorf
- Cubetas
- Puntas de micropipetas (Eppendorf)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Centrífuga (Janetzki)
- Agitador
- Estufa (Sharlab)
- Refrigerador
- Microscopio de fluorescencia Olympus BX (Olympus Optical Co.)
- Software Smart Capture (Vysis)

### 3.1.11. MICROSCOPIA.

Las preparaciones se evalúan usando un microscopio de epifluorescencia marca Zeiss modelo Axioskop y las imágenes se capturan con cámaras acopladas a detección de fluorescencia y se analizan con un sistema de análisis de imagen de epifluorescencia Photonics. Los estadios celulares se clasifican de acuerdo a lo descrito previamente en la literatura (Roig et al., 2005; Ghafari et al., 2008). En este sentido, en la figura 1.1 se muestran los estadios de la profase I estudiados mediante microscopia de epifluorescencia. De este modo, durante el leptoteno los

Los cromosomas comienzan su condensación e individualización y los elementos axiales (SYCP2 y SYCP3) se ensamblan sobre la estructura proteica de REC8 que previamente une a las cromátidas hermanas. Durante el zigoteno los homólogos inician su apareamiento y se unen mediante el elemento central del complejo sinaptonémico (SYCP1). Finalmente, durante el paquíteno el apareamiento y sinapsis se completa, también durante este estadio se evalúa la recombinación mediante la observación de puntos de MLH1 (*MLH1 foci*). Los ovocitos degenerados se identifican por la contractura y deformación del núcleo en presencia de la proteína SYCP1.

**Figura 1.1.** Clasificación de ovocitos de acuerdo a sus características observadas en microscopia acoplada a epifluorescencia.



Ovocitos estudiados mediante inmunofluorescencia y estudiados con microscopia de epifluorescencia. Los anticuerpos utilizados son SYCP1 en verde, REC8 en rojo, y en azul DAPI. a) Preleptoteno, b) Leptoteno, c) Zigoteno temprano, d) Zigoteno, e) Paquíteno y f) Ovocito degenerado.

### 3.1.12. TIPO DE ESTUDIO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El tipo de estudio y análisis estadístico empleado para la realización del primer objetivo específico son los que se describen a continuación:

### Modelo de estudio

- Unidad experimental: pozo de cultivo.
- Tipo de estudio: experimental (se incluye un factor control *vs* una sustancia experimental externa. El factor control se refiere al empleo de medio de cultivo control y la sustancia experimental se refiere a la aplicación de SCF en el caso del primer objetivo específico y el BPA en el segundo objetivo) y balanceado (se maneja el mismo número de casos en ambos grupos).
- Tratamientos: 4 (diferentes métodos de disgregación) x 2 (medios de cultivo) x 4 (número de tiempos analizados).
- n= 4 (número de muestras).

Cada disgregado es su propio control, ya que todos los ovocitos tanto tratados como no tratados se obtienen del mismo caso. Los resultados se expresan como el número de células por estadio: leptoteno, zigoteno, paquiteno y ovocitos degenerados para cada uno de los medios de cultivo y métodos de disgregación empleados.

### Análisis estadístico

Previo al análisis de los grupos, se realizan pruebas para determinar si los datos presentan una distribución normal. Posteriormente se verifica que las varianzas sean homogéneas. Dado que los datos tuvieron una distribución normal y homogeneidad en las varianzas se realiza el estudio estadístico por medio de un análisis de medidas repetidas seguido de la prueba de Dunnett. El *software* utilizado para la realización de estas pruebas son el Prism 4.0 y el GraphPad 5.01, se establece el nivel de significancia estadística en 95% ( $p < 0.05$ ).

#### 3.2.1. CULTIVO DE OVOCITOS FETALES HUMANOS EN PRESENCIA DE BPA.

Con el objetivo de evaluar el efecto del BPA en ovocitos fetales se realiza el cultivo siguiendo las metodologías que se utilizan para la realización de primer objetivo específico (metodología descrita en los apartados 3.1.2. a 3.1.6.). De acuerdo a los resultados que se han obtenido con respecto a los procesos de disgregación y medio de cultivo (revisar apartado 4.1.), para este cultivo se ha seleccionado la técnica de disgregación de fragmentos ováricos y el medio de cultivo suplementado con SCF.

Debido a que el BPA tiene efectos de disruptor hormonal, además de cultivar los ovocitos con el BPA, se utiliza como control positivo el estradiol ( $E_2$ ) en concentraciones equipotentes. Ambos reactivos se diluyen en dimetil-sulfóxido (DMSO) por lo que se realiza un cultivo con DMSO funcionando como control negativo. La descripción completa de cada uno de los medios se hace en el apartado 3.2.2.

### 3.2.2. MEDIOS DE CULTIVO.

Las características de los medios de cultivo que se emplean para el cultivo de ovocitos fetales expuestos a BPA son los siguientes.

#### **Medio de cultivo control**

La composición del medio de cultivo control es: Medio D-MEM y se suplementa con insulina 5µg/ml, transferrina 5µg/ml, selenio 5ng/ml, penicilina 100UI/ml, estreptomicina 100µg/ml y 100ng/ml de SCF.

#### **Medio de cultivo suplementado con DMSO**

La composición del medio de cultivo suplementado con DMSO es: Medio D-MEM y se suplementa con insulina 5µg/ml, transferrina 5µg/ml, selenio 5ng/ml, penicilina 100UI/ml, estreptomicina 100µg/ml, SCF 100ng/ml y DMSO 0.01%.

#### **Medio de cultivo suplementado con BPA**

La composición del medio de cultivo suplementado con BPA es: Medio D-MEM y se suplementa con insulina 5µg/ml, transferrina 5µg/ml, selenio 5ng/ml, penicilina 100UI/ml, estreptomicina 100µg/ml, SCF 100ng/ml y BPA. El BPA se añade en diferentes dosis para alcanzar las siguientes concentraciones: 1µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM y 30 µM.

#### **Medio de cultivo suplementado con E<sub>2</sub>**

La composición del medio de cultivo suplementado con E<sub>2</sub> es: Medio D-MEM y se suplementa con insulina 5µg/ml, transferrina 5µg/ml, selenio 5ng/ml, penicilina 100UI/ml, estreptomicina 100µg/ml, SCF 100ng/ml y BPA. El E<sub>2</sub> se añade en diferentes dosis para alcanzar las siguientes concentraciones: 1nM, 5nM, 10nM, 20nM y 30nM. Estas concentraciones se consideran equipotentes a las de BPA aun cuando no son equimolares.

#### **Material y equipo**

- Multiplacas de cultivo de 36 pozos (Nunc)
- Tubos cónicos 10ml (Nunc)
- Agua tridestilada y desionizada (MiliQ)
- Medio de cultivo D-MEM
- ITS (Invitrogen)
- SCF (Sigma)
- Penicilina (Sigma)
- Estreptomicina (Sigma)

- Poli-l-lisina (Sigma Aldrich)
- Bisfenol A (Sigma)
- Estradiol (Sigma)
- Puntas de micropipetas (Finntip)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Agitador
- Incubadora
- Pinzas de disección
- Campana de flujo laminar

### **3.2.3. METODOLOGÍA DE CULTIVO PARA OVOCITOS EXPUESTOS A BPA.**

Tal y como se menciona en el apartado 3.2.1. con el objetivo de evaluar el efecto del BPA en ovocitos fetales se realiza el cultivo siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.1.2. a 3.1.9. La modificación a estos protocolos es el uso de medio de cultivo suplementado con las sustancias a evaluar. La metodología se describe en la figura 3.2.

### **3.2.4. EXTRACCIÓN Y EXTENSIÓN DEL CULTIVO, INMUNOTINCIÓN, ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y ESTADÍSTICO.**

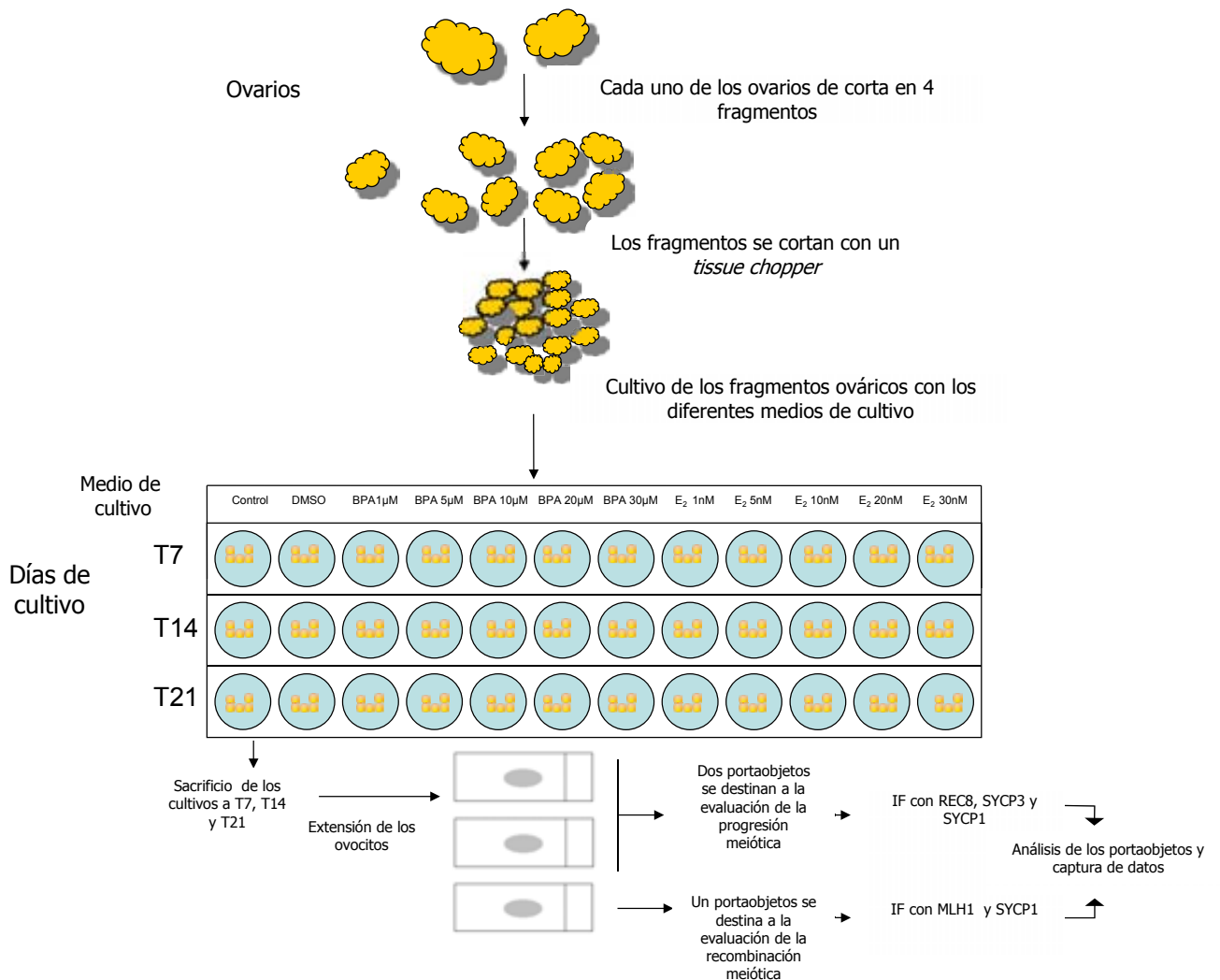
Los protocolos seguidos así como los reactivos e instrumentos que se utilizan para la extracción del cultivo, extensión de la muestra, inmunotinción, análisis microscópico y estadístico, se realizan siguiendo la misma metodología descrita en los apartados previos (del apartado 3.1.7. al 3.1.12.).

### **3.2.5. HIBRIDACIÓN *IN SITU* ACOPLADA A FLUORESCENCIA (FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION, FISH) SOBRE PORTAOBJETOS PREPROCESADOS CON INMUNOTINCIÓN.**

Esta técnica fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito por Roig et al., (2004), con algunas pequeñas modificaciones. El objetivo principal de utilizar esta técnica es la identificación del cromosoma 21 en preparaciones de ovocitos cultivados y expuestos a BPA y a las cuáles se les ha aplicado previamente la técnica de IF. Este tipo de metodología experimental permite analizar el número de *foci* de MLH1 en el cromosoma 21.

#### **Pasos previos a la hibridación**

- Se toma 1µl de sonda y se agregan 4µl de formamida al 70%.
- La mezcla de sonda y formamida se incuban a una temperatura de 75°C durante 5 minutos.

**Figura 3.2.** Metodología seguida para el cultivo de ovocitos expuestos a BPA.

- La muestra (portaobjetos) se deshidrata mediante el uso de una serie de etanoles (70%, 85% y 100%) previamente enfriados a una temperatura de -20°C.
- Se lava el portaobjetos con agua tridestilada y desionizada (MilliQ).
- Se seca el portaobjetos.

### Hibridación sonda-muestra

- Se colocan los 5µl de la sonda previamente desnaturalizada en el portaobjetos.
- Se cubre el portaobjetos con un cubreobjetos.
- Se sella el cubreobjetos con goma arábica.
- Se coloca el portaobjetos en la termo-placa. El protocolo seleccionado consiste en la elevación de la temperatura a 78°C durante 5 minutos. Posteriormente se disminuye la



temperatura a 37°C durante una hora con el objetivo de permitir la hibridación.

### **Pasos post-hibridación**

- Se retira la goma arábica mediante el uso de pinzas de disección.
- Se lava el portaobjetos con una solución 0.05xSSC a una temperatura de 45°C durante 5 minutos.
- Se deshidrata la muestra con una serie de etanoles (70%, 85% y 100%), previamente enfriados a una temperatura de -20°C.
- Se seca el portaobjetos.
- Se agregan 25µl de DAPI.
- Se coloca un nuevo cubreobjetos y se lleva a análisis en microscopia acoplada a epifluorescencia.

### **Reactivos y equipo**

- Formamida (Scharlau)
- 20xSSC (NaCl 0.3M, citrato trisódico 0.3M en agua tridestilada)
- Etanol (Merck)
- Sonda 21 (Aquarius)
- Agua tridestilada (MilliQ)
- DAPI (Sigma)
- Vectashield (Vector)
- Baño (Precistern)
- Cámara húmeda
- Centrifugadora (Janetzki)
- Cubetas
- Puntas de micropipetas
- Micropipetas
- Cubreobjetos (Menzel-glaser)
- Agitador

#### **3.3.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE OVOCITOS.**

Con el objetivo de evaluar la expresión génica, se utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). En el caso específico de este estudio se emplea una técnica de dos pasos. En el primer paso se extrae el ARN y se retro-transcribe y en un segundo paso se realiza la reacción en cadena de polimerasa y se cuantifica el gen de interés.

Para realizar la extracción de ARN se usa un kit comercial de Qiagen, el RNeasy fibrous tissue mini kit. Este sistema permite la obtención de ARN puro de tejidos ricos en colágeno. El kit de extracción se basa en un sistema de columnas de sílica que permiten la unión específica del RNA. Este sistema de extracción cuenta con dos pasos críticos para la obtención de material puro, estos pasos son: la eliminación de material proteico mediante proteinasa K y la eliminación de ADN mediante la incorporación de nucleasa específica para ADN. La labilidad del ARN es alta por lo que durante todo el proceso tanto de extracción, retro-transcripción y RT-PCR se utiliza un espacio estéril y libre de nucleasas.

El protocolo que se sigue para la extracción es el recomendado por el fabricante y a continuación se describe brevemente:

### **Extracción de ARN**

- Posterior a la extracción del cultivo mediante la técnica descrita en el apartado 3.1.6, los trozos de ovario se colocan en un homogenizador de tejido.
- Se agregan 300µl de Buffer RTL (Qiagen).
- El homogenizador se sumerge en nitrógeno líquido durante 2 minutos.
- Se extrae el homogenizador del nitrógeno líquido y con el uso de un émbolo se disgrega el tejido hasta que se obtiene una suspensión en la cual no se observan fragmentos de tejido.
- Se agregan 590µl de agua libre de nucleasas (Roche).
- Se agregan 10µl de proteinasa K (Qiagen).
- La suspensión con la nucleasa y la proteinasa K se incuba durante 10 minutos a una temperatura de 55°C.
- Posteriormente a la incubación se centrifuga la suspensión durante 3 minutos a una velocidad de 10,000*g*.
- El sobrenadante obtenido de la centrifugación se transfiere a un tubo nuevo en el cual se agregan 450µl de etanol 100%.
- La suspensión se transfiere a la columna de extracción, que se encuentra en un soporte (tubo de 2ml) y se centrifuga durante 15 segundos a una velocidad de 8000*g*.
- El filtrado obtenido se retira y se agregan 350µl de buffer RW1 (Qiagen) y se centrifuga nuevamente durante 15 segundos a una velocidad de 8000*g*.
- Se retira la solución y se agregan 10µl de DNasa a la columna de extracción.
- Se incuba durante 10 minutos a una temperatura de 25°C.
- Pasados los 10min, se agregan 350µl de buffer RW1 a la columna y se centrifuga nuevamente durante 15 segundos a una velocidad de 8000*g*.

- Se retira la solución y se agrega a la columna 500µl de buffer RPE (Qiagen) y se centrifuga 15 segundos a una velocidad de 8000*g*, este paso se repite en 2 ocasiones.
- La columna se transfiere a un tubo nuevo y se agrega 50µl de agua libre de nucleasas y se centrifuga durante 15 segundos a una velocidad de 8000*g*, este paso se repite en 2 ocasiones.
- Se retira la solución obtenida que contiene el ARN y se almacena hasta su retro-transcripción a una temperatura de -80°C.

### Material y equipo

- Kit de extracción RNeasy fibrous tissue mini kit de Qiagen (en el kit vienen incluidos los buffers RTL, RW1 y RPE, la proteinasa K, la DNasa y las columnas de silica)
- Beta-mercapto-etanol (Fluka)
- Etanol (Merck)
- PBS estéril (Gibco)
- Nitrógeno líquido
- Tubos Eppendorf *RNase free*
- Puntas de pipeta con filtro de 10, 100, 200 y 1000µl (Finntip)
- Homogenizador de tejido manual
- Micro-centrífuga (Eppendorf)
- Campana de flujo laminar
- Micropipetas Eppendorf
- Agua libre de nucleasas (Roche)

### 3.3.2. RETROTRANSCRIPCIÓN.

En este proceso, el ARN que se ha purificado es convertido a ADN de tipo complementario mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa. El proceso se divide en la síntesis de la primera cadena y en la expansión de copias de la misma. Esta última se realiza mediante PCR tiempo real. La metodología que se usa para realizar la retro-transcripción es la que se describe a continuación.

- Se agrega a un tubo libre de nucleasas: 1µl de oligonucleótidos 10mM, 100ng de *random primers*, 1µg de ARN y 13µl de agua libre de nucleasas.
- Se incuba la solución durante 5 minutos a una temperatura de 65°C.
- Transcurridos los 5 minutos se coloca en hielo durante 5 minutos.
- Se le agrega a la solución inicial: 4µl de 5x buffer de primera cadena, 1µl (0.1M) de DTT, 1µl de *RNase Out* y 1µl de SuperScript III (200u/µl).
- Se mezcla mediante pipeteo y se incuba durante 5 minutos a 25°C.
- Se incuba la solución durante 1 hora a 55°C.

- La reacción se inactiva calentando la suspensión durante 15 minutos a 70°C.
- Se agrega ribonucleasa H 2µl (4u) y se incuba durante 20min a 37°C.
- Se congela el producto a -20°C hasta su uso.

### Material y equipo

- Transcriptasa inversa (SuperScript III, Invitrogen)
- *Random primers* (Invitrogen)
- Oligonucleótidos (Takara)
- 5x buffer de primera cadena (Invitrogen)
- Agua libre de nucleasas (Biotools)
- Dithiothreitol DDT (Invitrogen)
- RNase Out (Invitrogen)
- Termo ciclador (Biometra)
- Tubos Eppendorf *RNase free*
- Puntas de pipeta con filtro de 10, 100, 200 y 1000µl
- Micropipetas Eppendorf
- Solución de limpieza inhibidora de nucleasas (Takara)

### 3.3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real permite la cuantificación mediante fluorocromos de la expresión génica. En otras palabras permite evaluar la cantidad de ADN que se sintetiza en cada ciclo de la reacción. Los agentes que permiten cuantificar esta expresión son el *SYBR Green* y las sondas específicas, en el caso específico de este trabajo se utiliza el *SYBR Green*.

El SYBR Green tiene la función de intercalarse con el ADN que se sintetiza y emitir fluorescencia. Durante el primer ciclo, la fluorescencia que se emite se eleva por un umbral llamado *crossing point* (Cp) o *cycle threshold* (Ct), este valor se emplea para comparar la expresión entre las diversas muestras. Con el objetivo de evaluar de la forma más precisa la expresión génica se emplea un gen de referencia el cual se conoce su expresión y que a su vez no se modifica al manipular la muestra. En este trabajo se ha empleado la subunidad 18s ribosomal; este gen ha demostrado su estabilidad en modelos *in vitro* de estrés oxidativo (Martínez et al., 2008). En el caso de este trabajo de tesis, la finalidad del procedimiento es la cuantificación del cADN, para ello se emplean *primers* específicos que limiten las secuencias de los genes de interés. Además de la cuantificación se valoran las curvas de fusión con el objeto de evaluar si el producto generado corresponde a la secuencia que se desea estudiar y no a productos menores provenientes de la auto-complementación entre los *primers*.

El protocolo empleado para la realizar esta técnica varía de acuerdo al equipo empleado, en este trabajo de tesis se ha utilizado un termo-ciclador de Biorad CFX que permite el estudio de multiplacas de 96 pozos. A continuación se describen los pasos que se realizan.

- Se prepara una solución madre que contiene: 12.5µl de *SYBR Green*, 9.5µl de agua libre de nucleasas, 2.0µl de cADN y 0.25µl de cada uno de los *primers*.
- Se prepara esta solución para cada uno de los 96 pozos.
- Se incluye en la placa un control negativo es decir en el cual no se le aplica cADN; un control positivo, en el cual no se agregaron *primers*. El objetivo de estos controles es verificar la presencia de posibles dímeros o contaminación por manipulación.
- La solución se coloca en la multiplaca, el volumen en cada pozo es de 25µl. Es importante señalar que todo el proceso se realiza a en penumbra para evitar la pérdida de fluorescencia.
- Se lleva la multiplaca al termo-ciclador, en la tabla 3.3. se muestra el protocolo empleado.

**Tabla 3.3.** Protocolo de RT-PCR empleado en la evaluación de la expresión génica.

Desnaturalización			
Temperatura °C	Duración en segundos	Pendiente (C/s)	Método de detección
95°	30	20	Ninguno
Ciclos (37 ciclos)			
Temperatura °C	Duración en segundos	Pendiente (C/s)	Método de detección
95°	05	20	Ninguno
55°	20	20	Ninguno
72°	15	20	Ninguno
Fusión			
Temperatura °C	Duración en segundos	Pendiente (C/s)	Método de detección
95°	0	20	Ninguno
63°	15	20	Ninguno
72°	0	0.1	Continúo
Enfriamiento			
Temperatura °C	Duración segundos	Pendiente (C/s)	Método de detección
04°	60	20	Ninguno

Los *primers* empleados para la evaluación de la expresión génica son específicos para los genes de las proteínas MLH1, RPA, H2AX, SPO11, SYCP1, ERα, ESRβ, ERRγ, NALP5, STRA8 y BLM. A continuación en la tabla 3.4 se muestran las secuencias de cada uno de ellos.

**Tabla 3.4.** *Primers* empleados.

Gen	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
<i>Stra8</i>	CCTCAAAGTGGCAGGTTCTGAA	TCCTCTAAGCTGCTTGCAATGC
<i>Nalp5</i>	CGAGGTCATGAGAGAACCATCTT	CACGCGGCGGTGAGA
<i>Mlh1</i>	GGGCTGTGTGAATCCTCAGT	TTCCTCTGTCCAGCCACTCT
<i>Spo11</i>	ACATTTTCAGCGGCTCCTAGA	TCTATGCCATGTGGATCAGC
<i>Rpa</i>	GGGATTGATGACCTCGAGAA	AGTACCACCTTCCCAGATG
<i>Sycp1</i>	GGTTCTTTCTGTTGCCCTCA	TGATCTCGGTGGTACGAACA
<i>Blm</i>	GCTGGAAGGAGTTGGAGTTG	AAATCCCACTGCTGAAACAA
<i>H2ax</i>	GGCAGCCCAGATTTTTATCA	GCTCGGCAGGAGTTACAGAC
<i>Era</i>	GGAGCTGAATCCAGAAACCA	AGCACGGATCTCATGGTCTC
<i>Erβ</i>	AGAGACCCTGAAGAGGAAGC	GCTTCTTTTAAAAAAGGCCT
<i>Erry</i>	TGGAGATCTTCGACATGCTG	GCCATCAGGTGGATCAAAGT
<i>h18s</i>	GTGGAGCGATTTGTCTGGTT	CGGACATCTAAGGGCATCAC

**3.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis de los resultados de la PCR en tiempo real se analizan mediante el uso del programa de Bio Rad CFX *manager*. Este programa utiliza un algoritmo para cuantificar la expresión génica de cada muestra con respecto al gen control (subunidad ribosomal *18s*) y con respecto al tiempo inicial de la muestra en estudio. A los resultados que se obtienen del programa Bio Rad CFX *manager*, se les evalúa los requisitos de normalidad. Posteriormente se verifica que las varianzas sean homogéneas. Dado que los datos tuvieron una distribución normal y homogeneidad en las varianzas se realiza el estudio estadístico por medio de un análisis de ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Bonferroni. El *software* utilizado para la realización de estas pruebas fue Prism 4.0 y GraphPad 5.01 se establece el nivel de significancia estadística en 95% ( $p < 0.05$ ).

## 4. Resultados





#### **4.1. RESULTADOS DEL PRIMER OBJETIVO ESPECÍFICO**

Artículo 1

##### **“A new culture technique that allows *in vitro* meiotic prophase development of human fetal oocytes”**

Human reproduction, vol.25, No.1 pp. 74-84, 2010 (doi:10.1093/humrep/dep351)  
Indice de impacto de Human Reproduction (2009): 3.859  
*Ranking* en revistas de Ginecología y Obstetricia 4/70 (primer cuartil)  
*Ranking* en revistas de Biología de la reproducción 2/26 (primer cuartil)

Artículo 2

##### **“Meiosis in a bottle: new approaches to overcome mammalian meiocyte study limitations”**

Genes, vol.2, pp. 152-168,2011 (doi:10.3390/2010152)  
Revista de nueva creación



# A new culture technique that allows *in vitro* meiotic prophase development of fetal human oocytes

M.A. Brieño-Enríquez<sup>1,2</sup>, P. Robles<sup>1</sup>, R. García-Cruz<sup>1</sup>, I. Roig<sup>1,3</sup>,  
L. Cabero<sup>4</sup>, F. Martínez<sup>2</sup>, and M. Garcia Caldes<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra Campus, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain <sup>2</sup>Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Medicina de la, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México <sup>3</sup>Molecular Biology Laboratory of Sloan Kettering Institute, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, NY, USA <sup>4</sup>Departament de Ginecologia i Obstetricia, Hospital de la Vall d' Hebron, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Correspondence address. Tel: +34 935811175; Fax: +34 935811025; E-mail: montserrat.garcia.caldes@uab.es

**BACKGROUND:** Little is known about the mechanisms that regulate meiosis in the human female fetus as a result of the technical difficulties in obtaining samples. Currently, there is no technique for human fetal oocyte culture that permits the maintenance of fetal ovarian tissue *in vitro* which allows the progression of meiosis in a reproducible and standardized way.

**METHODS:** Meiotic progression was analyzed following pairing-synapsis and recombination progress. A total of 7119 oocytes were studied and analyzed. The proteins used to evaluate meiotic progression were: REC8, SYCP1, SYCP3 and MLH1, studied by immunofluorescence. Four different sample disaggregating methods were used, two enzymatic (trypsin and collagenase + hyaluronidase) and two mechanical (puncture and ovarian fragments). Two different culture media were used, control media and stem cell factor (SCF)-supplemented media. The oocytes were studied at initial time T0, and then at T7, T14 and T21 days after culture.

**RESULTS:** The mechanical methods increased the total number of oocytes found at the different times of culture and decreased the number of degenerated oocytes. Independently of the disaggregation method used, oocytes cultured with SCF-supplemented media showed a higher proportion of viable oocytes and fewer degenerated cells at all culture timepoints. No evidence of abnormal homologous chromosome synapsis was observed. Meiotic recombination was only observed in oocytes mechanically disaggregated and cultured with supplemented media.

**CONCLUSIONS:** The oocytes obtained by mechanical disaggregating methods and cultured with SCF-supplemented media are able to follow pairing-synapsis and recombination, comparable to oocytes *in vivo*. The culture conditions described herein confirm the methodology as a standardized and reproducible method.

**Key words:** meiosis / recombination / oocytes / culture / stem cell factor

## Introduction

The human reproductive cycle starts at very early stages of development. During fetal life, the developing ovaries become populated with primordial germ cells and oogonia. These cells proliferate by mitotic division, then in a proportion meiotic prophase is initiated and these oogonia become oocytes.

Meiosis is the reductional division of the genome that produces haploid cells. The process begins *in utero* and ends if fertilization of oocytes occurs at metaphase II stage. The oocytes may remain arrested for up to 50 years until they continue meiotic prophase after the hormonal stimulus. As a consequence of the long period

of oocyte arrest, oocyte maturation is susceptible to disruption by nutritional imbalances, hormonal disturbances and environmental insults.

During fetal life, the first meiotic prophase occurs, and this phase is subdivided into leptotene, zygotene, pachytene and diplotene stages. During the first three stages, pairing-synapsis and recombination of homologous chromosomes is completed. After that, at diplotene, the homologous chromosomes separate from each other except in the areas where recombination had occurred, called chiasmata (cytological evidence of crossing over points).

The different stages of meiosis can be analyzed by classical cytogenetic and/or molecular cytogenetic techniques (Garcia *et al.*, 1987;

Cheng *et al.*, 1999; Lenzi *et al.*, 2005; Roig *et al.*, 2005; Robles *et al.*, 2009). The application of molecular cytogenetics allows for the analysis of the presence and distribution of specific chromosomes as well as proteins involved in meiosis (cohesin, synaptonemal complex and recombination proteins). During meiotic prophase, a tripartite chromosomal structure, known as the synaptonemal complex is formed between homolog chromosomes (Fawcett, 1956; Moses, 1977; Schmekel and Daneholt, 1995). The synaptonemal complex consists of two lateral elements (SCYP2 and SCYP3 proteins) and a central element (SCYP1 protein) (Heyting, 1996). The lateral elements are laid down upon a cohesin scaffold (REC8 protein), which is established during pre-meiotic events (Eijpe *et al.*, 2000, 2003; Pezzi *et al.*, 2000; Pelttari *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2001, 2004; Yang and Wang, 2009). The synaptonemal complex is the structure that mediates the pairing-synapsis and recombination processes (Offenberg *et al.*, 1998; Kolas and Cohen, 2004). During these processes the exchange between homologous chromosomes is performed, and mismatch repair protein (MLH1) indicates the places where meiotic recombination (crossing over) really occurs (see review, Hoffmann and Borts, 2004).

Little is known about the mechanisms that regulate meiosis in the human female fetus as a result of the technical difficulties in obtaining samples in optimal conditions. Currently, there is no reproducible standardized technique for the culture of human fetal oocytes that permits the maintenance of fetal ovarian tissue *in vitro* and allows meiotic progression. Previous studies in mouse and human reported the possibility of culturing oocytes and follicles (Schwartz and Roy, 1998; Hartshorne *et al.*, 1999; Lyrakou *et al.*, 2002; Biron-Shental *et al.*, 2004; Roig *et al.*, 2006; Romero and Smitz, 2008; Sadeu and Smitz, 2008); Biron-Shental *et al.* (2004) showed the survival of human fetal ovarian follicles from second- and third-trimester pregnancies for up to 4 weeks, but survival was not accompanied by an increase in the number of primary and secondary follicles. Lyrakou *et al.* (2002) and Roig *et al.* (2006) described meiotic progression in culture, but with very variable results. The variability of their results includes low number of cells at the end of culture and different efficiency rates in meiotic prophase progression between the different samples and times studying culture. Moreover, Lyrakou *et al.* (2002) reported the inability of cultured oocytes to complete meiotic recombination.

There are several studies where culturing conditions of oocytes from adult ovaries have been analyzed, with the objective of obtaining meiotic progression of MI and germinal vesicle oocytes (Sakaguchi *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2003; Iwata *et al.*, 2004; Caillaud *et al.*, 2005; De Matos *et al.*, 2008; Thomas *et al.* 2008; Caillaud and Gérard, 2009). In these studies the culture media was supplemented with various growth factors; stem cell factor (SCF) (Thomas *et al.*, 2008), epidermal growth factor (Caillaud and Gérard, 2009), leukemia inhibitory factor (LIF) (Caillaud *et al.*, 2005, De Matos *et al.*, 2008), activine (Thomas *et al.*, 2003), insulin-like growth factor (Sakaguchi *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2004), interleukin-1beta (Caillaud *et al.*, 2005), LH and FSH (Thomas *et al.*, 2003) with contradictory results. However, to date, none of these growth factors have been used in the culture of human fetal oocytes.

With the aim of evaluating pairing-synapsis and recombination in culture, cohesin REC8, synaptonemal complex proteins SYCP1, SYCP3 and mismatch repair protein MLH1 were followed by immunofluorescence (IF). This work describes, for the first time, a

technique of fetal human oocyte culture that permits meiotic progression *in vitro* with pairing-synapsis and recombination levels similar to the ones found in *in vivo* samples.

## Materials and Methods

### Biological material

Ovaries from four fetuses were obtained from the Vall d' Hebron Fetal Tissue Bank after legal interruption of pregnancy, following the rules of the Ethical Committee of the Hospital de la Vall d' Hebron, Barcelona, Spain. Gestational age was calculated from the last menstrual period, ultrasound analysis and foot length. All of the fetuses had a euploid karyotype obtained by prenatal diagnosis and confirmed in the laboratory with the karyotype of cultured, fetal ovary stroma fibroblasts (Roig *et al.*, 2003). The inclusion criteria were: euploid fetuses, gestational age between 18 and 22 weeks, and less than 2 h from the end of the obstetric procedure and the start of the culture process. Details of the biological material used are shown in Table I.

### Ovarian transport and dissection

All the ovaries were collected in D-MEM medium (Dulbecco's modified eagle medium) (Gibco BRL) with (100 IU/ml) penicillin (Gibco BRL), (50 µg/ml) streptomycin (Gibco BRL) and transported to the laboratory at 4°C. In the laboratory, under a laminar flux hood the ovaries were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) after which the annexial tissue (fallopian tubes and connective tissue) was dissected under microscopic observation. Each ovary was cut transversely to ensure equal inclusion of cortical and medullar ovarian regions, obtaining four equal-sized pieces of approximately 3 × 5 × 5 mm (width × depth × height) from each ovary. All of fragments were suspended in D-MEM. Two sections per ovary were used for each different method of disaggregation.

### Culture media

Control medium was D-MEM (Gibco BRL) supplemented with 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium (all from Sigma, Munich, Germany), 100 IU/ml penicillin (Gibco BRL) and 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL). SCF-supplemented media was control media supplemented with 100 ng/ml SCF (Sigma).

### Disaggregating methods

Four different methods were used with the aim of improving the progression of the oocytes in culture: two enzymatic and two mechanical. In all of the methods, the cells after initial disaggregation (T0) were seeded for the different times of culture, 7 days (T7), 14 days (T14) and 21 days (T21).

**Table I** Fetal characteristics

Case	GW	FL	W	Diagnosis	Karyotype
V133	18	3.3	495	Acrania	46,XX
V140	21	3.2	440	Cardiopathy	46,XX
V143	21	3.5	490	Renal malformation	46,XX
V144	20	3.1	425	Anencephaly	46,XX

GW, gestational weeks; FL, foot length in centimeters; W, weight in grams.

### Enzymatic methods

Two different enzymatic treatments were used to disaggregate the ovary: (i) 0.25% trypsin (Gibco BRL) and (ii) 0.1% collagenase IV with 0.01% hyaluronidase V (both from Sigma). Pieces of ovary were cut with a McIlwain Tissue Chopper (from Jed Pella Inc, Redding, CA, USA) into approximately 1 × 1 × 1 mm sections (40 sections per piece), and in both cases the sections were incubated in a shaking bath with the enzyme at 37°C, 30 min for trypsin and 1 h for the collagenase + hyaluronidase mix. After the incubation, the enzyme was washed off with 10 ml of D-MEM (serum free) and centrifuged for 10 min at 600g, the pellet was re-suspended with 5 ml culture media. The cells were cultured in Petri dishes (Nunc GmbH & Co. KG; Langensfeld, Germany) (treated with poly-D-lysine) (Sigma) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### Mechanical methods

Two mechanical methods were used: (i) the puncture method and (ii) ovarian fragments. Puncture method: the ovary pieces were washed four times with PBS and the ovary was punctured with entomologic needles in 0.5 ml culture medium. The suspension was centrifuged for 10 min at 600g and re-suspended and cultivated in media at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in Petri dishes (Nunc GmbH & Co. KG, Langensfeld, Germany) (treated with poly-D-lysine) (Sigma). Ovarian fragments method: two ovary pieces were cut with a McIlwain Tissue Chopper (from Jed Pella Inc, Redding, CA, USA) into 1 × 1 × 1 mm sections (40 sections per piece) and re-suspended in 5 ml media and cultured in 10 ml conical tubes (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) treated with poly-D-lysine (from Sigma) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

## Oocyte culture

Every 2 days, 50% of the culture medium was removed and restituted with fresh media. At T0, T7, T14 and T21 oocytes were removed from the Petri dishes or conical tube by 0.25% trypsin (5 min at 37°C), and the enzyme reaction was then diluted out with non-supplemented D-MEM medium. The cellular suspension obtained was centrifuged for 10 min at 600g, and immediately thereafter the pellet was re-suspended in 5 ml of PBS and re-centrifuged for 10 min at 600g.

## Oocyte spread preparation

To analyze the meiotic progression, the pellet was re-suspended in 1.5 ml PBS. Over slides and in a cyto-centrifuge chamber, 20 µl of this suspension and 500 µl of (0.02 M) sucrose solution were added and centrifuged for 15 min at 115g. Then, the slides were put in a humidified chamber at room temperature for 2 h and then fixed with 9% formaldehyde (pH 10; Sigma). After 24 h at room temperature, the slides were washed four times with 1% Photo-Flo (Kodak, Paris, France) and air-dried. Slides were stored at -80°C until analyzed.

## Immunofluorescence

To evaluate meiotic pairing-synapsis, two slides were analyzed, counting the total number of cells in all stages. A further slide was used for the analysis of meiotic recombination.

IF against the proteins of synaptonemal complex SYCP3 and SYCP1 (Abcam plc; Cambridge, UK), cohesin REC8 (kindly donated by Dr. Barbero, CSIC, Madrid, Spain), and mismatch repair protein MLH1 (BD Pharmigen, Becton Dickinson France S.A.S., Erembodegem, Belgium) was performed, as described elsewhere (Roig et al., 2005) with minor modifications. For cultured oocytes that showed a less permeable membrane, a permeation treatment using 0.1% Triton-X (Sigma) was used. Primary antibodies were diluted in PTBG (PBS, 0.2% bovine serum albumin (Sigma), 0.2% gelatin (Sigma) and 0.05% Tween 20 (Sigma) and incubated for 24 h at 4°C in humidified chamber. After washing off unbound antibodies with PBS, detection was performed with goat anti-rabbit FITC, goat anti-rabbit Cy3, goat anti-mouse Cy3 and goat anti-mouse FITC (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove PA, USA). Secondary antibodies were incubated for 1 h at 37°C in humidified chamber. Unattached secondary antibodies were washed off with PBS; finally, the signal was fixed with 1% formaldehyde. DNA was counterstained by applying an antifade solution (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) containing 0.1 µg/ml of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Sigma).

Oocytes were sub-staged according to morphological criteria described in previous studies (García et al., 1987; Roig et al., 2005; Ghafari et al., 2008). Accordingly, at leptotene chromosomes start condensation and individualization, and the axial elements (SYCP3) are assembled in previously associated sister chromatids (Cohesin REC8). During zygotene, homolog pairing starts by transverse filaments in a zipper-like fashion (SYCP1) with the final result being the union of both pairs of sister chromatids (synapsis). Finally, at pachytene bivalents are fully paired and all the elements look like one single structure. As previously was reported (Roig et al., 2005), oocytes in culture degenerate and this process is especially higher in oocytes at the pachytene stage. The evaluation of these oocytes was performed by the contraction and deformation of nuclei in the presence of SYCP1 protein.

## Image analysis and statistics

All samples were analyzed using an Olympus BX70 fluorescence microscope (Olympus Optical Co; Hamburg, Germany). Images were captured and produced using Smart Capture software. To match the fluorescence intensity that was observed by microscope, the images were processed using Adobe Photoshop. Statistical analysis was performed using SigmaStat and SigmaPlot software (to see specific tests applied, see results).

**Table II** Oocytes analyzed per culture time, disaggregating method and culture media

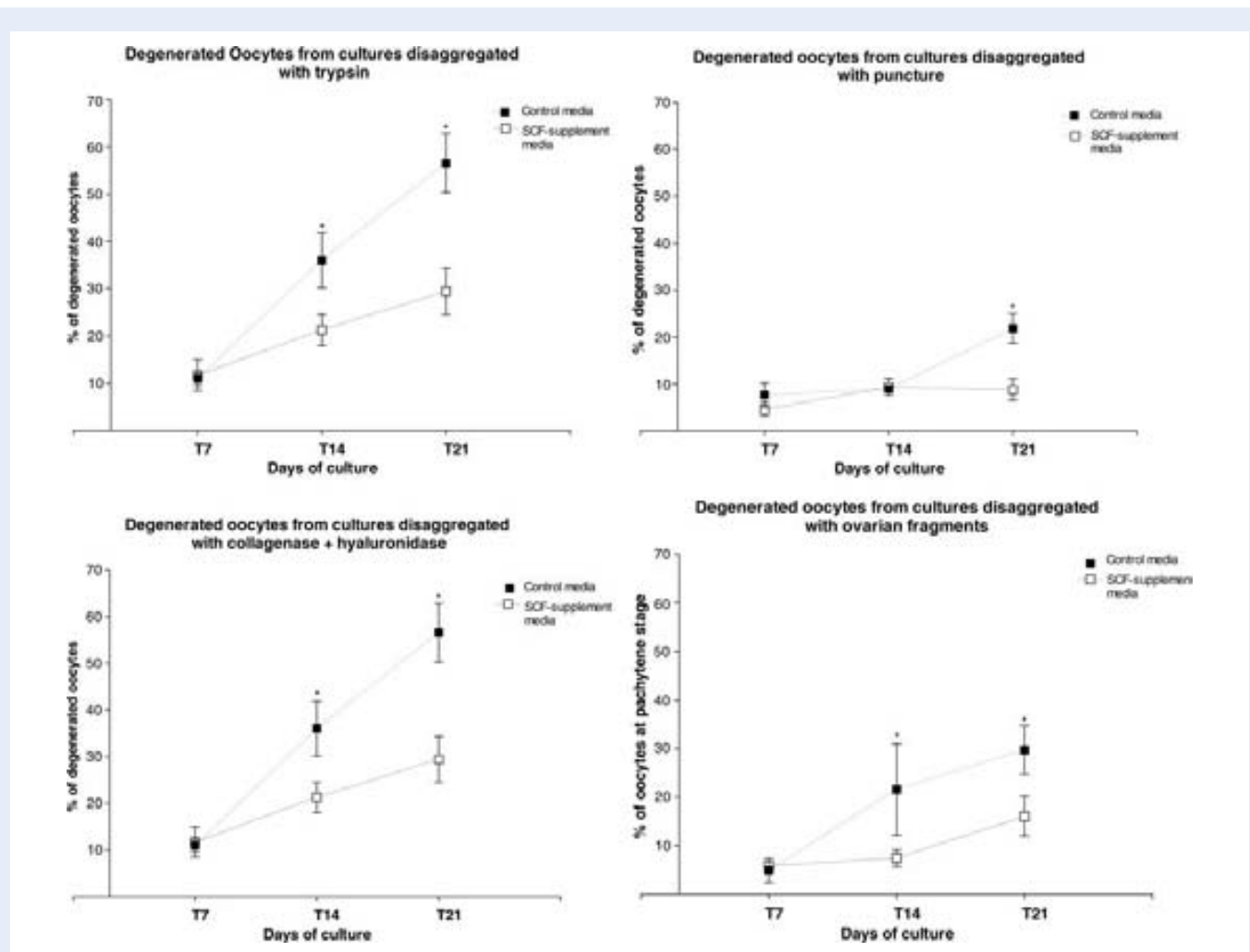
Disaggregating method	T0		T7		T14		T21	
	Control media	SCF-supplement media	Control media	SCF-supplement media	Control media	SCF-supplement media	Control media	SCF-supplement media
Trypsin	192	180	208		70	125*	42	93*
Collagenase + hyaluronidase	276	302	307		147	252*	135	193*
Puncture	348	319	383		262	319*	185	282*
Ovarian fragments	340	322	363		230	304*	180	234*

\*Statistical differences, chi-squared test,  $P \leq 0.05$  (differences between control media and SCF-supplemented media).

**Table III** Percentage of degenerated cells found per culture time, disaggregating method and culture media

Disaggregating method	T7		T14		T21	
	Control media	SCF-supplement media	Control media	SCF-supplement media	Control media	SCF-supplement media
Trypsin	10.9	11.7	36.0	21.3*	56.6	29.4*
Collagenase	10.7	11.9	35.8	21.1*	55.9	31.1*
Puncture	7.6	4.5	8.9	9.4	21.9	8.8*
Ovarian fragments	4.9	5.9	21.6	7.5*	29.8	16.0*

\*Statistical differences, chi-squared test,  $P \leq 0.05$  (differences between control media and SCF-supplemented media).



**Figure 1** Percentage of degenerated cells for the different methods of disaggregation and culture media. Control media: oocytes cultured with non-supplemented media. SCF-supplemented media: oocytes cultured with SCF-supplemented media. T0: after disaggregation. T7: 7 days after culture. T14: 14 days after culture. T21: 21 days after culture. \*Significant difference to control media, analyzed by chi-squared test  $P < 0.05$ .

## Results

A total of 7119 oocytes were analyzed by the time of culture, culture media and disaggregating method used (6593 to evaluated

disaggregation method and culture media, and 526 for meiotic recombination). Oocytes at meiotic prophase were found at all culture times in all of the biological material used (Table II). To evaluate pairing-synapsis processes two different slides for time of culture,



disaggregating method and culture media were used. An independent slide was used for meiotic recombination analysis. No statistical differences among each sample repeat ( $P = 0.65$  U Mann–Whitney) and inter-sample repeat ( $P = 0.55$  U Mann–Whitney), were found for samples treated with the same disaggregation method and culture media used.

### Disaggregating methods and culture media used

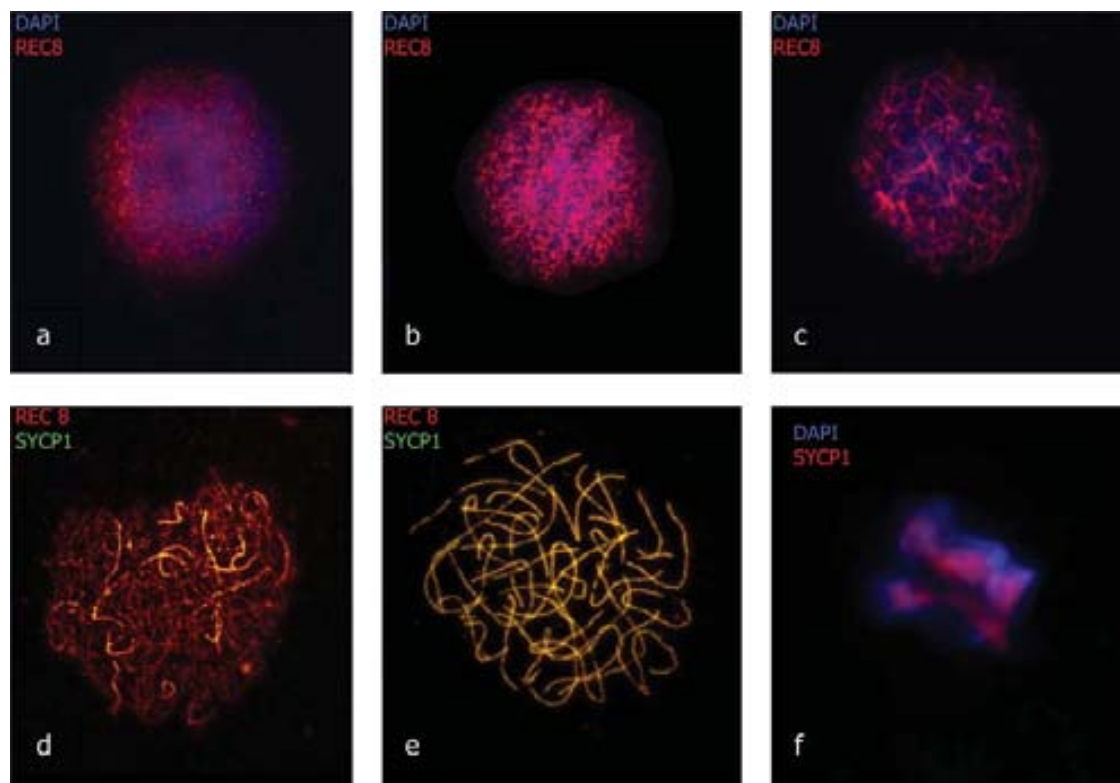
Four methods, two mechanical and two enzymatic, were applied to disaggregate the fetal ovary with the main goal of increasing the number of oocytes available to culture. Evaluation of the effect of the disaggregating method used on meiotic progression *in vitro* was performed by counting the number of oocytes at different prophase stages (leptotene, zygotene and pachytene) and the number of degenerated cells (oocytes). Degenerated cells (oocytes) were identified by the contraction and deformation of nuclei in the presence of synaptonemal complex protein I (SYCP1).

Enzymatic methods (trypsin and collagenase + hyaluronidase), independent of culture media used, decreased the total number of the oocytes found at the different times of culture (2522 versus 4071 from mechanical methods) ( $P = 0.002$  Mann–Whitney *U*-test) and increased the percentage of degenerated oocytes ( $P = 0.003$ , Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks) (Tables II and III). The oocytes obtained from ovaries disaggregated with trypsin had worse results than the oocytes obtained from ovaries disaggregated

with collagenase + hyaluronidase, for both parameters (number of oocytes and percentage of degenerated cells). There were 59.60% fewer oocytes obtained when cultured with control media and obtained from ovaries disaggregated with trypsin compared with oocytes cultured with control media and disaggregated with collagenase + hyaluronidase (180 versus 302) after 7 days of culture. At T14 there were 47.61% fewer oocytes obtained from ovaries cultured with control media and disaggregated trypsin compared with with collagenase + hyaluronidase (70 versus 147) and at T21, 31.11% fewer oocytes from ovaries disaggregated with trypsin than those obtained with the collagenase + hyaluronidase method (42 versus 135) ( $P = 0.001$ , one-way repeated measures analysis of variance, all pairwise multiple comparison procedures, Holm-Sidak method) (Table II).

In contrast, mechanical methods (puncture and ovarian fragments) increased the number of oocytes found at of all the times of culture and decreased the number of degenerated oocytes ( $P = 0.02$ , one-way repeated measures analysis of variance, all pairwise multiple comparison procedures, Holm-Sidak method (Tables II and III). However, the percentage of degenerated oocytes obtained varies at the different times of culture and disaggregating method used. At T7, the percentages were 7.6% in puncture method versus 4.9% in ovarian fragments; at T14 they were 8.9 versus 21.6% and at T21 the percentages were 21.9 versus 29.8%, but at all timepoints the difference was statistically significant (Table III and Fig. 1) ( $P = 0.003$ , Friedman repeated measures analysis of variance on ranks).

The differences between mechanical and enzymatic methods were greater when the culture was supplemented with SCF. Thus, the



**Figure 2** The first stages of meiotic prophase *in vitro* detected by immunofluorescence (IF) stained with antibodies versus REC8 and SYCP1: pre-leptotene (a), leptotene (b), early-zygotene (c), late-zygotene (d), pachytene (e) and degenerated oocyte (f).

survival of the oocytes was higher in the samples treated with SCF-supplemented media compared with control media ( $P = 0.013$ , paired  $t$ -test), as is shown in Table II. At the same time, there were no statistical differences between puncture and ovarian fragments methods in the total number of oocytes recovered at the different times of culture from SCF-supplemented media ( $P = 0.220$ , chi-squared test).

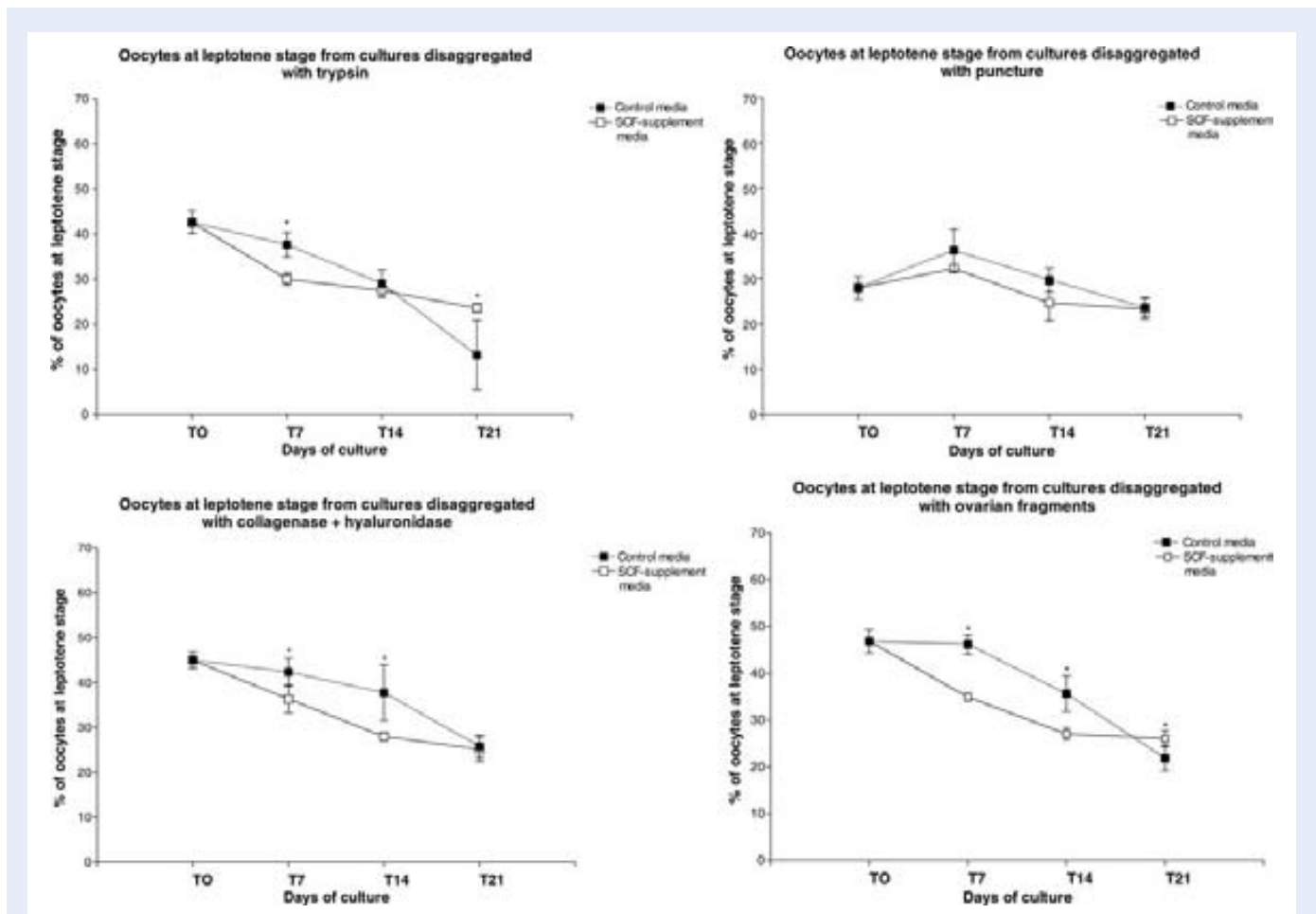
Degenerated oocytes also showed a time-course effect with an increase during culture time for all of the methods. Nevertheless, disaggregated oocytes with mechanical methods and cultured with SCF-supplemented media had lower percentages of degeneration, as compared with disaggregated with enzymatic treatment and cultured with control media (for puncture method; T21 21.9% control media versus 8.8% SCF-supplement media; ovarian fragments T21 29.8% control media versus 16.0% SCF-supplemented media) ( $P = 0.002$ , Mann-Whitney  $U$ -test) (Table III, Fig. 1).

### Meiotic progression

The paring-synapsis progress was evaluated following the correct alignment and synapsis of the homolog chromosomes along the different culture times. To evaluate the prophase stages, proteins REC8,

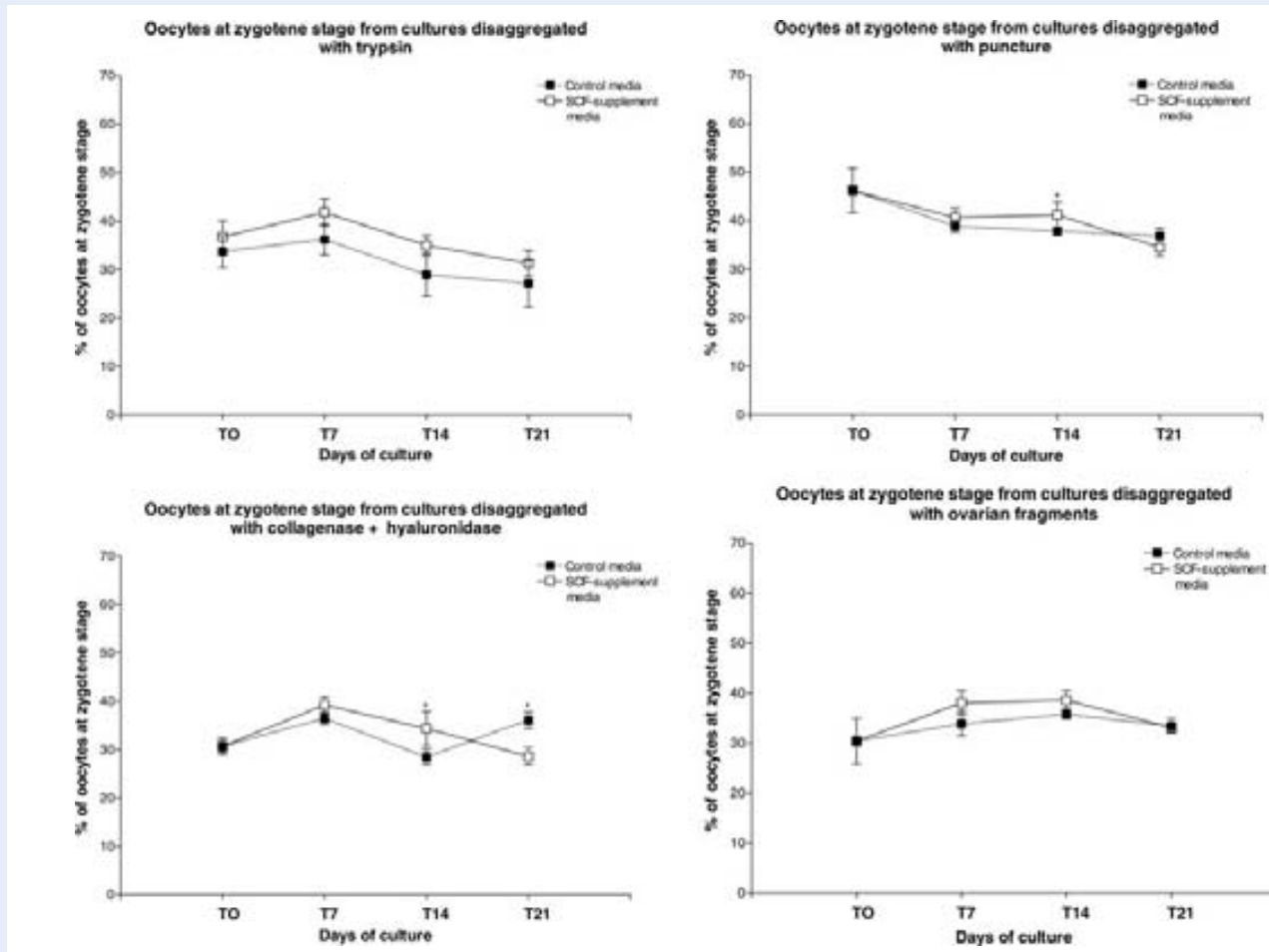
SYCP1 and SYCP3 were used (Fig. 2). Meiotic progression was analyzed by following the percentage of oocytes found in each sub-stage of meiotic prophase during the different culture times (Figs 3–5).

Different levels of meiotic progression were found between the different methods used. Ovaries disaggregated with mechanical methods and cultured with SCF-supplemented media showed an increase in the percentage of cells at pachytene ( $P = 0.04$ , chi-squared test) (Fig. 5). When the ovaries were disaggregated with trypsin and supplemented with SCF, the decrease of cells at pachytene showed by the oocytes with control media was not observed, but only was significant in T14 and T21. In cultured oocytes obtained from the collagenase + hyaluronidase method, a statistical increment of cells at pachytene was observed when the cultures were supplemented as was described for mechanical methods. The difference among collagenase + hyaluronidase method compared with mechanical methods was the lower number of total oocytes (Table II) and the high percentage of degenerated cells (Table III). In the mechanical methods, a significant increment of percentage of oocytes at pachytene was observed along all of the culture times. The elevation of oocytes at pachytene was observed in puncture as well as ovarian fragments.



**Figure 3** Percentage of oocytes at leptotene stage for the different methods of disaggregation and culture media. Control media: oocytes cultured with non-supplemented media. SCF-supplemented media: oocytes cultured with SCF-supplemented media. T0: after disaggregation. T7: 7 days after culture. T14: 14 days after culture. T21: 21 days after culture. \*Significant difference to control media, analyzed by chi-squared test  $P < 0.05$ .





**Figure 4** Percentage of oocytes at zygotene stage for the different methods of disaggregation and culture media. Control media: oocytes cultured with non-supplemented media. SCF-supplemented media: oocytes cultured with SCF-supplemented media. T0: after disaggregation. T7: 7 days after culture. T14: 14 days after culture. T21: 21 days after culture. \*Significant difference to control media, analyzed by chi-squared test  $P < 0.05$ .

The evaluation of meiotic recombination was analyzed by the number of MLH1 foci in each pachytene nucleus (Fig. 6). Only cultured oocytes from ovaries disaggregated with mechanical methods and treated with SCF showed crossover markers. No statistical difference was observed between the two mechanical methods ( $P = 0.92$ , chi-squared test; Table IV). In cultured oocytes obtained by both mechanical methods, the range of foci was from 29 to 67 per nucleus. The mean foci number varies at different times of culture: t7, 48.3 foci (range 29–60); T14, 50.5 foci (range 31–63); T21, 50.4 foci (range 28–64) but these differences were not significantly different from T0 (50.9 foci) (range 35–67) ( $P = 0.667$ , chi-squared test; Table IV). The values of mean foci number as well as range of cultured oocytes were not significantly different from values of mean foci number or range described previously in *in vivo* oocytes (Lenzi et al., 2005; Robles et al., 2009).

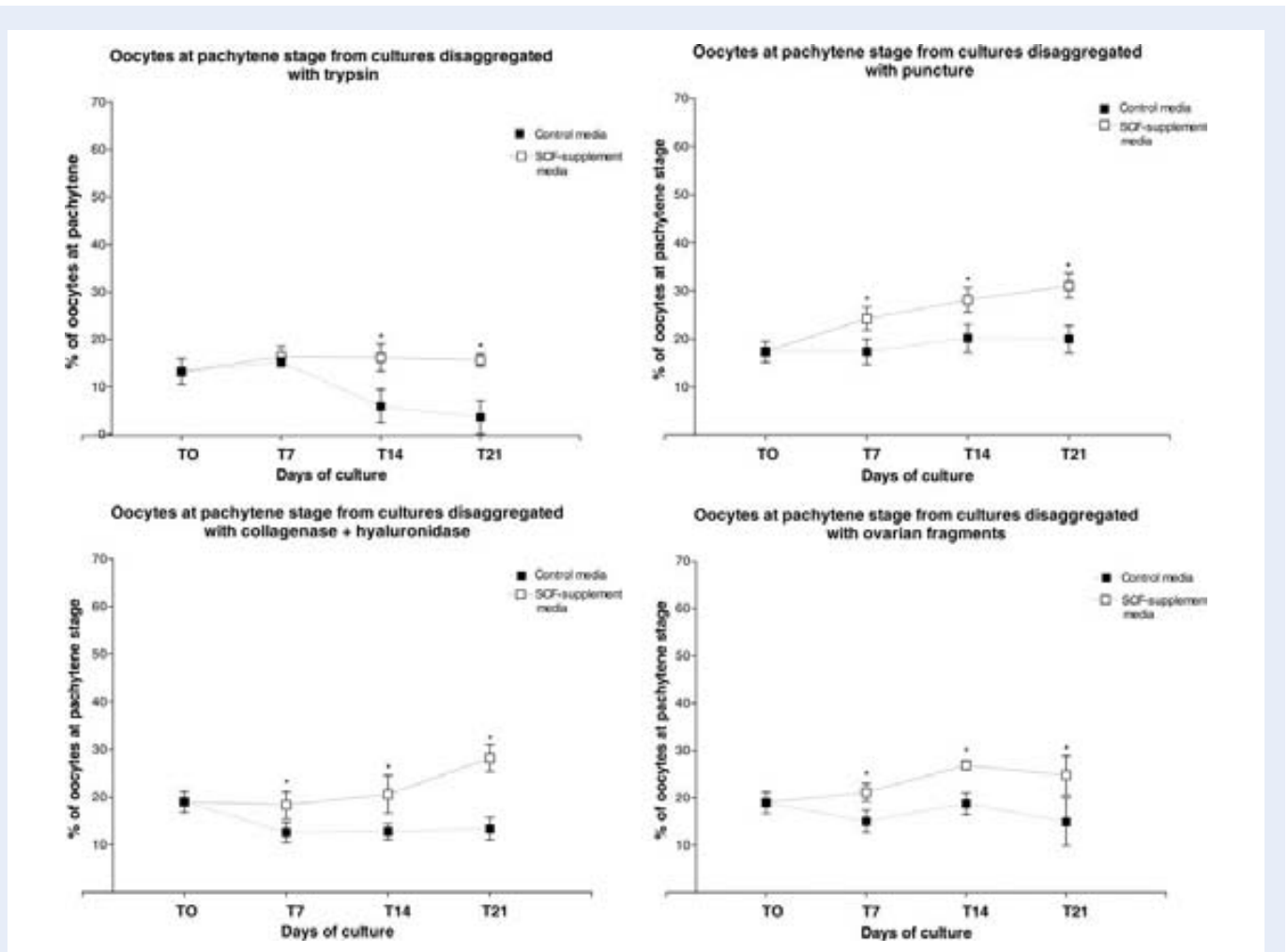
## Discussion

We have developed a new culture technique that permits the meiotic progression of human fetal oocytes *in vitro*. The technique is standardized and reproducible for all of the samples and times studied.

Cultured human fetal oocytes had a meiotic progression similar to that reported as a normal progression of the oocytes *in vivo* (Roig et al., 2005).

### Disaggregation of the ovary by mechanical methods improves the oocytes development in *in vitro* culture

Four different methods of disaggregation of ovaries were evaluated. Mechanical methods increased the number of oocytes at different culture times with a lower number of degenerated cells. However, differences in the methodology of the two mechanical disaggregation techniques, such as acute damage as the result of the puncture method, may prove to be important. Acute damage of the cells could increase the number of degenerated cells in the first days of culture at T7. This, tissue fragments, which presented fewer degenerated cells at T7, presented a higher number on T21. The increase of degenerated cells on day 21 of culture could be related to the variability of nutrients and oxygen received by the cells (Senbon et al., 2003). Cells in the core of the tissue block may receive lower



**Figure 5** Percentage of oocytes at pachytene stage for the different methods of disaggregation and culture media. Control media: oocytes cultured with non-supplemented media. SCF-supplemented media: oocytes cultured with SCF-supplemented media. T0: after disaggregation. T7: 7 days after culture. T14: 14 days after culture. T21: 21 days after culture. \*Significant difference to control media, analyzed by chi-squared test  $P < 0.05$ .

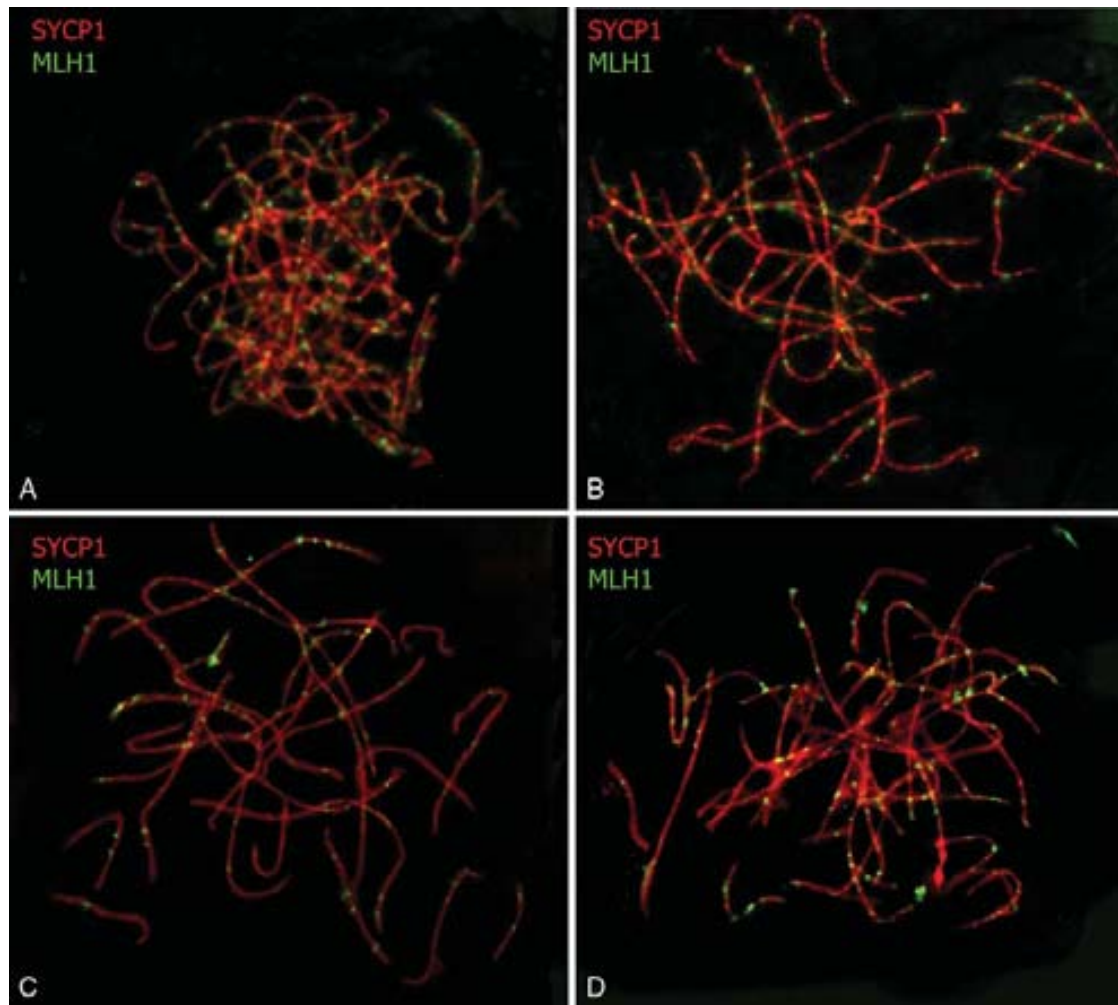
oxygen and nutrient concentrations than outer cells, and as a consequence, internal cells could degenerate more. Nevertheless, taking into account the results obtained, mechanical disaggregation methods permits a higher number of oocytes to progress through prophase I than enzymatic disaggregation methods.

Enzymatic methods decreased the number of oocytes at different culture times and increased the number of degenerated cells. Whilst enzymes permit the disaggregation of the tissue, the adverse effects on the oocyte outweigh the benefits. The enzymes used may change the normal characteristics of the cellular membrane, affecting the permeability and fluidity. Some membrane proteins may be modified, disrupting the normal function of the oocyte membrane structural proteins and membrane receptors (Melican *et al.*, 2004). The enzymes might also activate oxidative stress pathways, increasing free radicals and inducing cell damage (Miyano, 2005). Interactions between oocytes, fibroblasts and precursors of theca and granulosa cells are required for the development of the ovary. Interruption of the autocrine and paracrine signals could produce an imbalance of the micro-ambience developed by all the ovarian cells, affecting the

survival/development of oocytes in culture (Yamamoto *et al.*, 1999; Senbon *et al.*, 2003). Thus, and in accordance with adverse effects found in our results, the use of enzymatic methods to disaggregate human fetal ovarian tissue before culture is not recommended.

### SCF supplementation of the culture media promotes oocyte survival and meiotic progression

SCF-supplemented media permits a higher number of oocytes to reach the pachytene stage and also to decrease the percentage of degenerated cells, independent of the disaggregating method used. Previous reports described the expression of SCF receptor in human primordial germ cells, fetal and adult ovaries (Abir *et al.*, 2004; Høyer *et al.*, 2005; Carlsson *et al.*, 2006). SCF is involved in the activation of normal pathways in the progression of meiotic oocytes. SCF works as a pro-mitotic and anti-apoptotic factor (Bedell and Mahakali, 2004; Høyer *et al.*, 2005; Carlsson *et al.*, 2006). The stimulation of SCF receptor, c-kit, induces the activation



**Figure 6** MLH1 foci in different culture days detected by IF stained with antibodies versus SYCP1 and MLH1. Initial time (a), 7 days after culture (b), 14 days after culture (c) and 21 days after culture (d).

**Table IV** MLH1 mean foci number per cell at pachytene during the different days of culture using both mechanical methods and SCF-supplemented media

Days of culture	N	Mean foci	Range	SD
T0	158	50.9	35–67	6.3
T7	109	48.3	29–60	7.6
T14	143	50.5	31–63	5.7
T21	116	50.4	28–64	6.3

of cyclines, anti-apoptotic factors such as Ras, Rac1 and Myc, and also activates intra-nuclear receptors (kitL) (Hoei-Hansen et al., 2007). Activation of all these pathways, neutralizing the mitochondrial apoptotic machinery and inhibiting caspase activity (Pesce et al., 1993; Zeuner et al., 2007) could explain the decrease in degenerated cells found in SCF-supplemented media cultures. On the other hand, the

activation of SCF receptor allows for the production of oocytes-derived growth differentiation factor 9 and bone morphogenic protein 15 (Thomas and Vanderhyden, 2006), factors which are implicated in the maturation of the oocytes in puberty and adulthood. In this sense, the multiple effects of the SCF could affect the mitotic division of oogonia and also stimulate progression of mice (Moniruzzaman et al., 2007) and porcine oocytes (Moniruzzaman and Miyano, 2007) as well as the possible role in growth initiation of human primordial follicles (Abir et al., 2004).

#### Meiotic prophase progression

Previous studies reported the occurrence of irregular meiotic progression in human cultured oocytes (Roig et al., 2006); the technique presented here is the first one that permits meiotic progression in a similar way in all samples cultured. Oocytes disaggregated with mechanical methods and cultured with SCF-supplemented media produce *in vitro* the characteristics of pairing-synapsis and recombination processes described *in vivo* (Roig et al., 2005). Results obtained in this

study show a higher percentage of oocytes at the pachytene stage, as compared with the data described by Roig *et al.* (2006).

The results obtained using mechanical methods show more homogeneity of meiotic prophase evolution, compared with previous reports (Roig *et al.*, 2006). This could be explained by the disaggregation method and culture media applied; but the influence of a strict control of the gestational age, characteristics of transport, duration between obstetric procedure and culture, could also play a role in the final result.

### Recombination

Lyrakou *et al.* (2002) previously described the normal pairing and synapsis in oocytes at culture, but they did not observe meiotic recombination *in vitro* and proposed an inability of the oocytes to reach recombination in *in vitro* culture.

In the present study it is shown for the first time, that meiotic recombination can be observed in culture, using an adequate culture media and disaggregating process. Lyrakou *et al.* (2002) used SCF in combination with other growth factors such as LIF. LIF is used in the culture of mice stem cells with the objective of increasing the number of non-differentiated cells. Meiotic progression is a process of differentiation, obtaining a high number of cells in culture is important, but cell differentiation is also important. In this sense, the absence of recombination described by Lyrakou *et al.* (2002) could probably be related to non-complete differentiation of mice oocytes in culture, under the influence of culture media supplements used (LIF and fetal calf serum). Alternatively, the manipulation during culture, the time of culture and gestational age could explain the absence of recombination described by Lyrakou *et al.* (2002).

The culture of oocytes from ovaries disaggregated with mechanical methods and cultured with SCF-supplemented media increases the number of differentiated oocytes. The progress of the cells through meiosis is possible because the growth factors stimulated cellular pathways required for growth and differentiation. In preserving the integrity of the tissue and cell activity, the survival and meiotic progression of oocytes is possible. Using mechanical disaggregation methods and supplemented media, we were able to reproduce the conditions of the fetal ovary and the *in vitro* meiotic recombination was possible. The oocytes in culture showed the same characteristics of mean foci number of MLH1 foci, as compared with initial time T0 and previous reports of *in vivo* oocytes (Lenzi *et al.*, 2005; Robles *et al.*, 2009) without differences between the different days of culture.

The efficiency of the technique and the consistency of the results allow us to propose this as a good model for the study of reprotoxicology. The advantages of a model that mimics some of the in uterus conditions of fetal oocytes, are: (1) direct evaluation of processes related to non-studied processes involved in human female meiosis, (2) evaluation of toxics in the first stages of meiotic prophase and (3) the replacement of experimental animals.

## Acknowledgements

This work would have been impossible without the support of the clinicians and biologists of the Fetal Tissue Bank, Pathology and Gynecology Departments of the Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, as well as all of the people of the Department of

Physiology and Pharmacology of the School of Medicine of San Luis Potosí, México.

## Funding

This work was supported by grants BFU2006-12951 from the Ministerio de Educacion y Cultura (Spain), #0000447445 Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (AECI), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107) (Spain) and National Council of Science and Technology (CONACYT) #166825 and SEP-2004-COI-4591 (México). The English of this manuscript has been corrected by a native English-speaking instructor of English at our University.

## References

- Abir R, Fisch B, Jin S, Barnnet M, Kessler-Icekson G, Ao A. Expression of stem cell factor and its receptor in human fetal and adult ovaries. *Fertil Steril* 2004;**82**(Suppl. 3):1235–1243.
- Bedell MA, Mahakali ZA. Genetic analysis of Kit ligand functions during mouse spermatogenesis. *J Androl* 2004;**25**:188–199.
- Biron-Shental T, Fisch B, Van Den Hurk R, Felz C, Feldberg D, Abir R. Survival of frozen-thawed human ovarian fetal follicles in long-term organ culture. *Fertil Steril* 2004;**81**:716–719.
- Caillaud M, Gérard N. In vivo and in vitro effects of interleukin-1beta on equine oocyte maturation and on steroidogenesis and prostaglandin synthesis in granulosa and cumulus cells. *Reprod Fertil Dev* 2009;**21**:265–273.
- Caillaud M, Duchamp G, Gérard N. In vivo effect of interleukin-1 beta and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;**22**:3–26.
- Carlsson IB, Laitinen MP, Scott JE, Louhio H, Velentzis L, Tuuri T, Aaltonen J, Ritvos O, Winston RM, Hovatta O. Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction* 2006;**131**:641–649.
- Cheng EY, Chen YJ, Disteche CM, Gartler SM. Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: nonhomologous pairing in pachytene. *Hum Genet* 1999;**105**:191–196.
- De Matos DG, Miller K, Scott R, Tran CA, Kagan D, Nataraja SG, Clark A, Palmer S. Leukemia inhibitory factor induces cumulus expansion in immature human and mouse oocytes and improves mouse two-cell rate and delivery rates when it is present during mouse in vitro oocyte maturation. *Fertil Steril* 2008;**90**:2367–2375.
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R. Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complex. *J Cell Sci* 2000;**113**:673–682.
- Eijpe M, Offenbergh H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1 beta and SMC3. *J Cell Biol* 2003;**160**:657–670.
- Fawcett DW. The fine structure of chromosomes in meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* 1956;**2**:403–406.
- Garcia M, Dietrich M, Freixa L, Vink ACG, Ponsa M, Egozcue J. Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light microscopy. *Hum Genet* 1987;**77**:223–232.
- Ghafari F, Gutierrez CG, Hartshorne GM. Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Develop Biol* 2008;**7**:87.



- Hartshorne GM, Barlow AL, Child TJ, Barlow DH, Hulten MA. Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture. *Hum Reprod* 1999;**14**:172–182.
- Heyting C. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1996;**8**:389–396.
- Hoei-Hansen C, Kraggerud SM, Abeler VM, Kaern J, Rajpert-De Meyts E, Lothe RA. Ovarian dysgerminomas are characterized by frequent KIT mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Mol Cancer* 2007;**2**:6–12.
- Hoffmann ER, Borts RH. Meiotic recombination intermediates and mismatch repair proteins. *Cytogenet Genome Res* 2004;**107**:232–248.
- Høyer PE, Byskov AG, Møllgård K. Stem cell factor and c-kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 2005;**234**:1–10.
- Iwata H, Hashimoto S, Ohta M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 2004;**127**:159–164.
- Kolas NK, Cohen PE. Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination. *Cytogenet Genome Res* 2004;**107**:216–231.
- Lenzi ML, Smith J, Snowden T, Kim M, Fishel R, Poulos BK, Cohen PE. Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis I in human oocytes. *Am J Hum Genet* 2005;**76**:112–127.
- Lyrakou S, Hulten MA, Hartshorne GM. Growth factors promote meiosis in mouse fetal ovaries in vitro. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:906–911.
- Melican D, Butler R, Hawkins N, Chen LH, Hayden E, Destremes M, Williams J, Lewis T, Behboodi E, Ziomek C et al. Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 2004;**63**:1549–1563.
- Miyano T. JSAR Outstanding Research Award. In vitro growth of mammalian oocytes. *J Reprod Dev* 2005;**51**:169–176.
- Moniruzzaman M, Miyano T. KIT-KIT ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles. *J Reprod Dev* 2007;**53**:1273–1281.
- Moniruzzaman M, Sakamaki K, Akazawa Y, Miyano T. Oocyte growth and follicular development in KIT-deficient Fas-knockout mice. *Reproduction* 2007;**133**:117–125.
- Moses MJ. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations. *Chromosoma* 1977;**60**:99–125.
- Offenberg HH, Schalk JAC, Meuwissen RLJ, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJJ, Heyting C. SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* 1998;**26**:2572–2579.
- Pelttari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, Moens P, Santucci-Darmanin S, Jessberger R, Barbero JL, Heyting C et al. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:5667–5677.
- Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 1993;**118**:1089–1094.
- Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Pérez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martínez-A C, Barbero JL. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J* 2000;**14**:581–592.
- Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martínez AC, Rufas JS, Barbero JL. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* 2001;**3**:761–766.
- Prieto I, Tease C, Pezzi N, Buesa JM, Ortega S, Kremer L, Martínez A, Martínez-A C, Hultén MA, Barbero JL. Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res* 2004;**12**:197–213.
- Robles P, Roig I, Garcia R, Briño M, Martín M, Barbero JL, Cabero LI, Garcia-Caldes M. Analysis of recombination along chromosome 21 during human female pachytene stage. *RBM Online* 2009;**6**:784–794.
- Roig I, Vanrell I, Ortega A, Cabero L, Egozcue J, Garcia M. The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. Stromal ovarian culture cytogenetic diagnosis. *Cytotechnology* 2003;**41**:45–49.
- Roig I, Robles P, Garcia R, Martín M, Egozcue J, Cabero L, Barambio S, Garcia M. Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. *Hum Reprod* 2005;**20**:2463–2469.
- Roig I, Garcia R, Robles P, Cortvrindt R, Egozcue J, Smitz J, Garcia M. Human fetal ovarian culture permits meiotic progression and chromosome pairing process. *Hum Reprod* 2006;**21**:1359–1367.
- Romero S, Smitz J. Improvement of in vitro culture of mouse cumulus-oocyte complexes using PDE3-inhibitor followed by meiosis induction with epiregulin. *Fertil Steril* 2008; doi:10.1016/j.fertnstert.2008.10.016.
- Sadeu JC, Smitz J. Growth differentiation factor-9 and anti-Müllerian hormone expression in cultured human follicles from frozen-thawed ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2008;537–548.
- Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction* 2000;**123**:135–142.
- Schmekel K, Daneholt B. The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol* 1995;**5**:239–242.
- Schwartz JR, Roy SK. In vitro culture of hamster ovarian primary interstitial cells: effect of serum. *Biol Reprod* 1998;**59**:1187–1194.
- Senbon S, Hirao Y, Miyano T. Interaction between the oocytes and surrounding somatic cells in follicular development: lesson from in vitro culture. *J Reprod Dev* 2003;**49**:259–269.
- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;**12**:4–19.
- Thomas FH, Walters KA, Telfer EE. How to make a good oocyte: an update on in vitro models to study follicles regulation. *Hum Reprod Update* 2003;**9**:541–555.
- Thomas FH, Ismail RS, Jiang JY, Vanderhyden BC. Kit Ligand 2 promotes murine oocyte growth in vitro. *Biol Reprod* 2008;**78**:167–175.
- Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S, Miyano T. Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 1999;**52**:81–89.
- Yang F, Wang PJ. The mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond. *Genome Dyn Basel Karger* 2009;**5**:69–80.
- Zeuner A, Signore M, Martinetti D, Bartucci M, Peschle C, De Maria R. Chemotherapy-induced thrombocytopenia derives from the selective death of megakaryocyte progenitors and can be rescued by stem cell factor. *Cancer Res* 2007;**67**:4767–4773.

Submitted on July 13, 2009; resubmitted on September 1, 2009; accepted on September 8, 2009



Review

## Meiosis in a Bottle: New Approaches to Overcome Mammalian Meicyte Study Limitations

Ignasi Roig <sup>1,\*</sup> Miguel Angel Brieno-Enriquez <sup>2,3</sup> and Montserrat Garcia Caldes <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Cytology and Histology Unit, Cell Biology, Physiology and Immunology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Cell Biology and Medical Genetics Unit, Cell Biology, Physiology and Immunology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain;  
E-Mail: mikelenriquez@hotmail.com

<sup>3</sup> Pharmacology and Physiology Department, School of Medicine, Universidad Autònoma de San Luis Potosí San Luis Potosí Mexico

\* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: ignasi.roig@uab.cat (I.R.); montserrat.garcia.caldes@uab.cat (M.G.C.); Tel.: +34-935814396 (I.R.); +34-935811905 (M.G.C.); Fax: +34-935813357 (I.R.); +34-935811025 (M.G.C.).

Received: 7 December 2010; in revised form: 13 January 2011 / Accepted: 19 January 2011 /

Published: 12 February 2011

---

**Abstract:** The study of meiosis is limited because of the intrinsic nature of gametogenesis in mammals. One way to overcome these limitations would be the use of culture systems that would allow meiotic progression *in vitro*. There have been some attempts to culture mammalian meicytes in recent years. In this review we will summarize all the efforts to-date in order to culture mammalian sperm and oocyte precursor cells.

**Keywords:** meiosis; *in vitro*; mammals

---

### 1. Introduction

Gametogenesis is the process by which gametes are produced. During this process, haploid cells are obtained from diploid progenitors. This is achieved by executing the meiotic program which involves two successive rounds of cell division after a single round of DNA replication. The proper execution of this program is essential to maintain species ploidy from one generation to the next, as well as to

provide genetic variation to the species. Thus, errors produced during meiosis can compromise fertility or cause aneuploid embryos. In humans, the impact of errors produced during meiotic divisions is an important social problem. Aneuploidy is the major cause of mental retardation and developmental issues present in newborns [1]. Moreover, it is believed that most miscarried conceptions do not come to term because of the presence of an unbalanced karyotype [1]. Therefore, to understand the origin of aneuploidy and infertility, it is crucial to know in detail the processes that happen during meiosis and gametogenesis.

In mammals, gametogenesis is initiated early in development. In mice, around embryonic day (E)7.25, specification of germ cells occurs. During this process, a group of cells from the most proximal epiblast is induced to differentiate into primordial germ cells (PGCs) [2,3]. These newly formed PGCs will proliferate and migrate to the embryonic gonads, where they can be found around E10.5. Once in the gonads, PGCs undergo several rounds of mitosis. By E12.5, PGCs express some meiotic-specific genes, such as *Sycp3* and *Dmc1* [4]. Until this point this process is sex-independent. Then, in male gonads, germ cells downregulate meiotic-specific genes and initiate a mitotic arrest [5]. In contrast, in the female gonads, germ cells enter meiosis, complete meiotic prophase and arrest at dictyate stage at least until puberty begins. Meiotic entrance is regulated by the presence of intrinsic factors like *Dazl*, [6] and also by extrinsic ones like retinoic acid (RA) [7,8]. Fetal female gonads have much higher concentration of RA than male ones, most likely because male gonads express the enzyme responsible for catalysis of RA, CYP25B1 [7]. Moreover, *in vitro* studies have shown that addition of RA to culture media induces meiosis initiation in male embryonic gonads *in vitro* [7,8].

Later on, in the adult life of mammalian species, gender-related differences regarding evolution of meiosis can be found. While females only have a limited pool of arrested meiotic cells available to complete meiosis during their reproductive lifespan, males have an almost unlimited capability to create spermatocytes, thus allowing males to have a significantly longer fertility than females. In adult males, arrested cells resume mitotic activity, produce spermatogonia which constantly enter meiosis to produce sperm during most of the life of the individual.

The first knowledge about mammalian meiosis arose from the descriptive analysis of different species gonads, like rodents (especially mouse and rat), some domestic animals (pig, dog, cattle, *etc.*) and primates, especially humans. With the production of genetically engineered mice and their use to study the role of different genes in mouse meiosis, a more detailed image of the mechanisms regulating meiosis and gametogenesis have been drawn. Nevertheless, in most cases, and because of the intrinsic nature of female gametogenesis, most studies are performed using male samples. It is important to notice that male and female gametogenesis, and meiosis in particular, does not respond the same way to the same perturbation [9,10]. Therefore, analysis should be carried out in both male and female gonads.

While studies of genetically engineered mice have provided a wealth of information regarding many molecular pathways, there are technical limitations imposed by this approach. Some of the more important are that the production of genetic engineered mice needs time and substantial economical efforts. Thus, it would be very valuable to have a tool to predict the outcome of such an expensive experiment. Moreover, having an *in vitro* culture that could allow meiosis *in vitro* would certainly reduce the number of experimental animals needed to be used in future studies. In addition, it would allow a more detailed analysis of the human meiotic process to try to address human infertility and



aneuploidy origin directly. An additional advantage of *in vitro* approaches is that they allow for manipulation of meiotic events such as RNA interference and introduction of environmental toxins, as just two examples. In this sense, some efforts have been focused on promoting entrance of cells into the meiotic program or to culture meiocytes *in vitro*. In this review we will summarize all the efforts carried out until now to study meiosis *in vitro* and analyze the perspective of this new exiting approach for the study of mammalian meiosis.

## 2. Stem Cells Culture to Obtain Sperm-Like and Oocyte-Like Cells

One of the strategies to obtain meiotic cultures arises from the knowledge that germ cells can spontaneously originate from embryonic stem (ES) cells in culture [11–14]. ES cells (ESCs) are derived from the inner cell mass of the preimplantation embryo and maintain pluripotency, defined as the capacity to develop into any cell type of somatic ectodermal, mesodermal, or endodermal lineages. ESCs can also develop into the germline, as shown by mouse blastocyst injection [15] and by *in vitro* differentiation of mouse and human ESCs (see below). Several reports have recently documented primordial germ cell- (PGC), sperm-, and oocyte-like cell development after mouse and human ESC differentiation (see below).

Several groups noticed that ES cells in culture can differentiate into germ cells precursors. This process occurs at a very low rate if no stimuli are applied. To improve it, some groups have now developed different strategies to promote differentiation of mouse ES cells into germ cells, some of them obtaining haploid cells able to produce progeny.

The first approach to obtain mammalian germ cells was done by Toyooka and colleagues [13]. Because it has been shown that bone morphogenic proteins (BMPs) have a crucial role in promoting germ cell differentiation *in vivo* [16,17], these authors co-cultured ESCs with M15 or trophoblast cells that produce high levels of BMPs to induce ESC differentiation into PGCs *in vitro*. ESCs were genetically modified and contained either GFP or the LacZ gene in the endogenous *Vasa* loci, which allowed PGC detection. First signs of differentiation were detectable after one day of co-culture. Exposure to BMPs allowed the recovery of almost 300 times more PGCs than in unexposed ESC cultures. These knock-in PGCs were transplanted into host testis and eight weeks after transplant sperm sharing the same markers than the transplanted PGCs were found [13]. Nevertheless, no functionality test of the obtained sperm was performed. More recently, other studies have demonstrated that BMPs can also induce PGC differentiation in human ESCs [18].

Geijsen and colleagues [11] used RA to induce ESC differentiation into PGCs. In this case, *in vitro* differentiation did not stop at PGCs and haploid cells were detectable after culture. Although meiotic progression was highly inefficient in this culture setting, this study represents the first one that obtained haploid cells from mouse ESCs *in vitro*. Moreover, 20% of the haploid cells used in a test to *in vitro* fertilize oocytes formed embryos that progressed to blastocyst stage [11]. Other groups have used similar approaches using RA to generate haploid cells from mouse ESCs [12]. In this study, approximately 30% of the cells in culture after 72 h of RA induction were haploid. Furthermore, 12 animals were born after intracytoplasmic injection of the *in vitro*-generated haploid cells into unfertilized oocytes and transfer to pseudo-pregnant females ( $N = 65$ ). Nevertheless, the offspring died prematurely, probably due to imprinting problems of the male haploid cells.

Another study has reported the derivation of germ cells from bone marrow stem cells [19]. In this case, RA was used as an inducing agent to obtain PGC-like cells. However, these cells were unable to restore spermatogenesis when transplanted to germ cell-depleted testis.

More recently, the first report of differentiation of male haploid germ cells from human ES cells has been published [20]. In this study, the authors purified PGC-like cells from human ES cells and induced their differentiation to meiotic and post-meiotic male germ cells by overexpressing DAZ gene family members: *DAZL*, *BOULE* and *DAZ*. Results show that after 14 days of culture, *TEKT1*, a marker of mature sperm, can be detected by RT-PCR. Moreover, approximately 2% of the cells in culture are haploid. This study represents the first demonstration that human germ cells can be also differentiated from pluripotent ES cells *in vitro*.

Hubner *et al.* [21] reported the differentiation of mouse ESCs into PGCs, these cells were transfected with a GFP reporter under the control of the germ cell-specific promoter *Oct4*. GFP was expressed in undifferentiated ESCs but was expected to disappear in differentiated cells, these authors also analyzed different markers of differentiation like *c-KIT*, *Vasa* expression and *c-KIT*–/GFP+ postmigratory germ cells with high *Vasa* expression. Germ cells that down-regulated OCT4 expression entered meiotic prophase. During days 12 to 26, the floating ESC-derived aggregates developed into morphologically visible follicle-like structures that contained putative oocytes. These follicular structures also expressed *Gdf9*, steroidogenic enzymes, and produced estrogen. On day 26, the follicles released oocytes of 50–70 µm in diameter that expressed the oocyte specific markers *Zp2/3* and *Figla*. Furthermore, pre-implantation stage embryos were observed and were likely the result of parthenogenetic oocyte activation. Notably, both XX and XY mouse ESC lines produced oocyte-like cells. Nuclear SYCP3 was detected in ESC-derived oocyte-like cells; however, no pairing-synapsis was detected.

Subsequently, Novak *et al.* [23], performing a protocol similar to the one described by Hubner and colleagues [21], observed the presence of follicle-like aggregates and elevated levels of estrogens in the supernatant after 12 days of culture of mouse ESCs. Differentiation to oocyte-like cells of 40% was observed between 14 and 16 days of culture. The differentiation consisted of cells being SYCP3 positive; however, nuclear localization was variable. Moreover, instead of the long chromosome axial core alignment of SYCP3, only short filamentous structures were observed in the aggregates, suggesting an abnormal loading of SCP3. The expression of meiotic genes like *Dmc1*, *Sycp1* and *Sycp2*, was not detected, and synapsis was disrupted. In both cases [21], the ESC-derived oocyte-like cells produced were not able to progress into meiosis.

Similarly, Lacham-Kaplan [22] found differentiation for two to three weeks in testicular conditioned media resulted in an increased number and size of follicle-like structures [22,23]. These follicle-like cell clusters contained putative oocyte-like cells of up to 35 µm in diameter and expressed markers of oogenesis, like *Stra8*, *Figla*, and *Zp3*. However, mouse ESC-derived oocyte-like cell maturation, oocyte functionality or their ability to be fertilized and produce offspring was not demonstrated. Furthermore, meiotic progression of ESC-derived oocyte-like cells was not assessed.

Recently, Qing *et al.* [24], using a two-step method, induced the differentiation of mouse ESCs into oocyte-like cells [24]. Under certain *in vitro* conditions, ESCs can aggregate and grow, forming a colony known as an embryoid body (EB). In Qing *et al.* [24], PGCs were differentiated within the EB around day 4 of culture. After that, EBs were co-cultured with ovarian granulosa cells. After

10 days, these cells formed germ cell colonies as indicated by the expression of the two germ cell markers *Vasa* and *Sycp3*. These cells also expressed oocyte-specific genes (e.g., *FIGalpha*, *GDF-9*, and *Zp1-3*) but not any testis-specific genes. EB cultured alone, or cultured in granulosa cell-conditioned medium or EB co-cultured with Chinese hamster ovary (CHO) cells, or cultured in CHO cell-conditioned medium did not express any of these oocyte-specific markers. Immunocytochemistry analysis using antibodies against VASA or GDF-9 confirmed that some double-positive oocyte-like cells were generated within the germ cell colonies. These results demonstrate that granulosa cells were effective in inducing the differentiation of ESC-derived PGCs into oocyte-like cells most likely through direct cell-to-cell contacts.

Kerkis *et al.* [25] used a RA-induced differentiation protocol to produce sperm-like and oocyte-like cells from male mouse ESCs. In different experiments they generated male or female gametes, using genetically manipulated or preselected ES cells. XY mouse ESCs were differentiated in suspension as EBs for 4 days without RA and 4 more days with 0.1  $\mu$ M RA. Cells on the periphery of the EBs appeared to have a different morphology and express germ cell markers including *Ssea1*, *Oct4*, *Dazl*, *Vasa*, *Stra8*, *Sycp1*, *Sycp3*, and *Zp3*. Although these transcripts were also expressed in undifferentiated ESCs, the expression of *Gdf9* and *Acrosin* was low to absent in ESCs and substantially increased during differentiation. By cytogenetic analysis, they observed a chromosome reduction in ES-derived GC. Finally, they concluded that ESCs with XY chromosomes can produce both types of gametes under the same experimental conditions [25]. Differentiation will depend on their positional and temporal information within the EB context.

Finally, Salvador *et al.* [26], using GFP as a marker under the regulation of the *Gdf9* promoter, reported the identification of oocyte-like cells in cultures of XX mouse ESCs [26]. After differentiation for a day on feeders or in suspension without leukemia inhibitory factor (LIF), GFP positive oocyte-like cells were detected in the supernatant. These cells expressed *Gdf9* and *Zp3*. Surprisingly, the addition of LIF to the culture media increased the number of GFP positive cells by three-fold. However, follicle-like structures were not detected, and the oocyte-like cells quickly degenerated, which the authors related to the inability of the ESC-derived oocytes to properly execute meiosis.

Many challenges need to be overcome to achieve robust and functional gamete differentiation from ESCs. Particularly, the low efficiencies of ESC-derived oocyte-like cell maturation reported to date may be unavoidable because naturally in mammals most oocytes undergo atresia during fetal development. However, the optimization of methods to direct ESC-derived germ cell specification, oocyte commitment, and oocyte maturation may increase efficiencies and enable functional oocyte production.

### 3. Culture of Adult Male Germ Cells

Cultures of mammalian male germ cells are rare and not many reports have been published. Nevertheless, the few published studies succeeded in promoting meiotic progression *in vitro* and obtaining haploid cells.

Some of the first attempts to culture mammalian male germ cells were carried out by Durand and colleagues over the past decade [27–31]. Over this time they have developed a co-culture technique

that allows meiotic progression of rat spermatocytes. Briefly, it consists of co-culture of prepuberal rat spermatocytes on a monolayer of Sertoli cells in a bicameral chamber [31]. In their experiments, meiotic progression was followed by different approaches, including electron microscopy ultrastructural analysis of the cultured cells, analysis of the DNA content by fluorescence activated cell sorting (FACS) and expression of some postmeiotic specific genes. All analysis performed suggested the existence of meiotic progression *in vitro* achieving haploid cells after three weeks of culture [27]. Moreover, when the culture was seeded with BrdU-labeled leptotene-stage spermatocytes, BrdU-positive round spermatids were observed after 21 days of culture [30]. More importantly, evolution of spermatogenesis *in vitro* followed similar dynamics to what happened *in vivo* [28]. Nevertheless, the functionality of the haploid cells has never been tested.

Another approach to culture male germ cell was described by Feng and colleagues [32], who purified undifferentiated type A spermatogonia from 6 days postpartum mice and immortalized them by overexpressing TERT. Then, they induced their differentiation by culturing them in the presence of stem cell factor (SCF), which is known to play a crucial role in the initiation of spermatogenesis. After a week in culture, there was a seven-fold increase in the number of cells with four sets of chromosomes, presumably indicating an increase in the number of primary spermatocytes. During culture, SYCP3 positive cells were evident and chiasmata could be observed in Giemsa-stained cells. After two weeks in culture, expression of postmeiotic markers, like *SP-10* and *protamine-2*, were observed. Approximately 60% of the cells in culture were haploid after three weeks of SCF induction. Nevertheless, authors never observed any structure resembling sperm tails nor did they test the competence of the haploid cells obtained in culture [32].

Finally, another culture system has been developed to cultivate testis cells from non-obstructive azoospermic *in vitro* fertilization clinic patients [33]. Testis biopsies were dissociated and the obtained cells were cultured in a collagen matrix for 12 days. Analysis after this time revealed a decrease in the number of pachytene-stage spermatocytes as well as an increase in the number of spermatids. Thus, authors suggest that human haploid cells can be formed *in vitro*, but again more experiments should be performed to check if these spermatid-like cells are able to fertilize oocytes [33].

Culture of adult spermatocyte cell precursors is nowadays close to being a reality. Obtaining haploid cells from diploid progenitors represents complete meiotic progression *in vitro*. Therefore, it is only a matter of time until more refined techniques will be available to address some key issues about meiosis. In fact, some studies are already using cultures of spermatogenic cells to test toxicity of certain drugs or agents on mammalian gonads [29,34].

#### **4. Attempts to Culture Mammalian Fetal Oocytes**

The culture of human fetal oocytes has been tried by a few researchers and a great variety of techniques as well as a variety of culture media has been evaluated. The oldest reports are from Blandau [35] who reported the presence of living oogonia and oocytes for almost 80 days [35]. During culturing, he observed active migration of oogonia, mitotic divisions and growth of the fetal tissue. He concluded that oogonia entered meiosis, and generated oocytes that reached late stages of meiosis. Later reports [36] analyzed the progression in culture of human ovarian fragments from fetuses of 16–20 weeks of gestation. Ovaries used were from fresh as well as frozen samples. Results, published

by Zhang and colleagues included the persistence of primordial follicles in culture and oocytes that had extruded a polar body.

More recently reports from [37] evaluated human fetal ovaries aged 13–16 weeks. Ovaries were cultured in mini-blocks ( $0.3 \times 0.3 \times 0.3$  mm) with minimal essential medium alpha (MEM $\alpha$ ) supplemented with fetal calf serum (FCS) and follicle stimulating hormone. Another two supplements were added depending on the group (human female serum and FCS suitable for stem cells). The cultures were analyzed after 7 to 40 days. These authors observed that the number of oocytes and the percentages of zygotene stage and pachytene stage cells increased with the time of culture. The elevated initial number of degenerated cells decreased with the time of culture. Oocytes cultured with human female serum and FCS for stem cells showed a higher number of oocytes after 14 days of culture. Cultured oocytes showed the presence of lateral element of synaptonemal complex, indicating meiotic progression. The analysis of the formation of the synaptonemal complex showed a high index of asynaptic nucleus, self synapsis and non-homologous synapsis. The authors concluded that human oocytes survive in culture, and more importantly, can progress through prophase I *in vitro*.

A few years later, the first mouse fetal ovary culture was described [38]. One hundred and sixty-two ovaries from 13, 14 or 17 days post-coitum embryos were cultured in  $\alpha$ MEM supplemented with fetal calf serum for stem cells (ES-FCS), penicillin, and streptomycin. This media was used for half of the cultures; the other half was cultured with the addition of stem cell factor (SCF), insulin growth factor I and LIF. The cultures were analyzed for meiotic pairing-synapsis and recombination after three or four days. Authors reported a significant increase in the number of oocytes that reached pachynema after four days of culture in those supplemented cultures. However, none of the cultured oocytes displayed MLH1 (a cytological marker for crossover formation which appears around pachynema). Nevertheless, authors concluded that supplementation with SCF, LIF and IGF-I promotes female meiosis *in vitro*, and proposed that this increment in cells at pachytene stage could be related to an increment of premeiotic oogonias that entered meiosis because of the growth factor stimuli.

Roig *et al.* [39] described another culture approach to promote oocyte I progression *in vitro*. Ovaries were cut in blocks (approximately  $15 \times 20 \times 20$  mm) and cultured in  $\alpha$ MEM, supplemented with human albumin, insulin, transferrin, selenium, penicillin and streptomycin for one to five weeks. Analysis of meiotic progression focused on homologous pairing as well as synapsis progression. This study demonstrated that human fetal oocytes could survive *in vitro* up to five weeks [39]. In three of the four cases they observed meiotic progression. Although the percentages of oocytes at the different stages of meiosis as well as the proportions among the different cases were different from the ones observed in fresh oocytes, pairing and synapsis efficiency was similar to those described in fresh oocytes. Finally, these authors also described an increment of degenerated cells in relation with the time of culture.

More recently another report has been published in which the effects of different culture approaches are compared in order to culture human fetal oocytes [40]. Authors reported that disaggregation by mechanical methods increased the total number of oocytes found in culture, but also decreased the number of degenerated cells. Similarly, oocytes cultured with SCF, independently of the disaggregation method used, showed a higher proportion of oocytes that reached pachynema and decreased the number of degenerated cells. This study also evaluated meiotic recombination in oocytes from ovaries disaggregated with mechanical methods and cultured with SCF. The ranges of MLH1

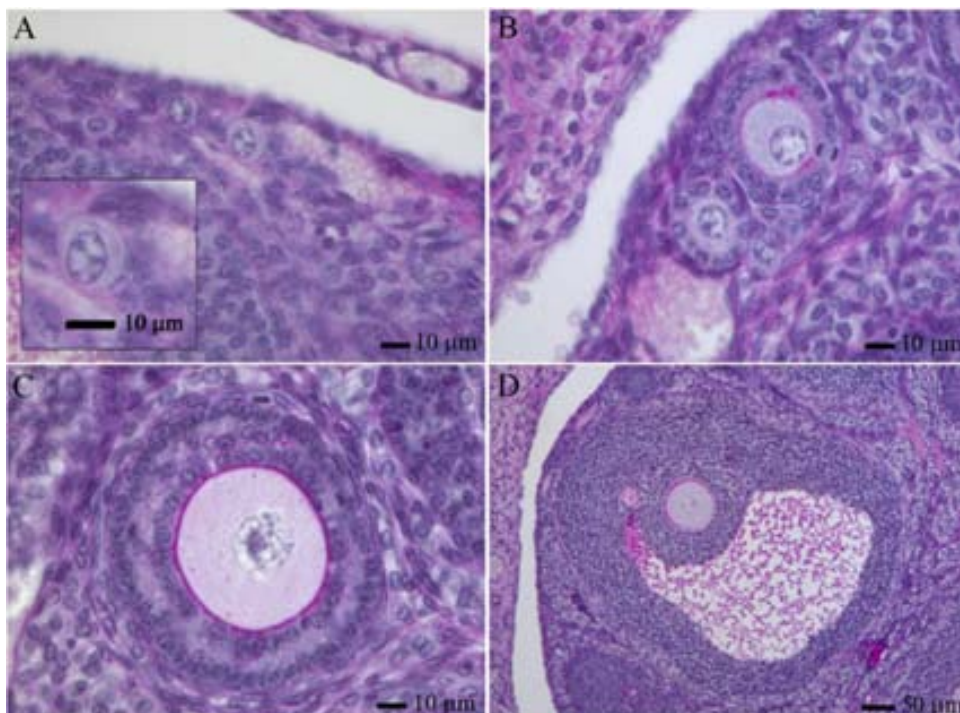
foci found in cultured oocytes, as well as the means, mimic the values reported in fresh oocytes. Therefore, authors concluded that oocytes cultured with this method resembled, for the studied parameters, the oocytes found *in vivo*.

In summary, all the published reports to-date present a promising future in order to culture fetal oocytes. It is now clear that oocytes can be maintained and progress *in vitro*, but more interestingly, that meiosis can be initiated in culture.

## 5. Follicle and Oocyte Growth and Development in Culture

Adult mammalian ovaries contain follicles, which are the structures in which a post-prophase I oocyte develops. They consist of the oocyte themselves, surrounded by granulosa and theca cells. In the adult ovary, one can find follicles at different developmental stages, the most abundant are primordial follicles. Based in morphology, human follicles can be classified (Figure 1, reviewed by [41]). Human follicles can be classified as primordial follicles (those that contain a primary oocyte embraced by flattened granulosa cells, Figure 1A), primary follicles (have a full cuboidal granulosa cell layer, Figure 1B), preantral follicles (growing primary oocytes enclosed by several granulosa cell layers, Figure 1C) and antral follicles (which contain a cavity with follicular fluid, granulosa cells differentiate into mural and cumulus cells, Figure 1D). Except for the oocytes from antral follicles, that usually need a short period of manipulation and maturation in culture, oocytes from small antral follicles and pre-antral follicles require long periods of growth *in vitro* to acquire developmental competence. There are many publications related to this field, in this sense we will only mention some of the most representative ones.

**Figure 1.** Follicle development in the adult mouse ovary. Primordial (A), primary (B), pre-antral (C) and antral (D) follicles stained with PAS-hematoxylin [42].



The success of *in vitro* growth (IVG) and *in vitro* maturation (IVM) methods are influenced by the characteristics of the tissue, the culture environment and the stage of the oocyte at the start of culture. Many culture systems have been developed to culture follicles based on the needs of each species. To obtain the best results, culture medium, supplementation, temperature, concentration of oxygen and culture method have to be standardized.

The most common medium used is minimal essential medium (to cite a few studies, [43,44]) although other media like Waymouth [45] and McCoy's 5a have also been used [43,45,46]. Different medium supplements has been used to improve follicle development at culture, some examples are: antibiotics/antimycotics, ITS (insulin, transferrin and selenium), growth factors, gonadotrophins, activin or apoptosis inhibitors. Doses of gonadotrophins are critical for the proper progression of the culture. For instance, supplemented medium with follicle stimulant hormone (FSH) and LH are essential for the progression of the follicle from preantral stages to antral follicle stage [46–48].

The supplementation with serum is a topic of considerable debate. Serum contains multiple substances which could promote cell adhesion and proliferation. Serum acts as a source of albumin, which balances the osmolarity, and as a scavenger that protects from potentially harmful molecules like free oxygen radicals. Serum also acts as a source of precursors for steroid biosynthesis [49]. However, supplementation with serum has been related to a diminution of proliferation rates [50,51]. Other important conditions are the media used for transportation and maintaining the tissue [52,53], culture medium pH [54], characteristics of the extracellular matrix [54,55] and the percentage of oxygen [56]. The efficacy of supplements depends on the culture system used but it is considered that FSH, insulin, activin A, growth and differentiation factor 9 (GDF9) promote follicular development and survival (reviewed by [57]).

The characteristics of the ovary vary with the species used; in other words, ovaries from mouse, cow, cattle, pig or human are anatomically and physiologically different. In mouse, follicles can be obtained from neonatal, pre-puberal or adult ovaries. Follicles from neonatal or pre-puberal ovaries permit a greater number of follicles to be obtained than adult ovaries. Moreover, obtaining the follicles from neonatal and pre-puberal ovaries also improves follicular culture because all follicles are at the same developmental stage, they are all primordial follicles [58,59].

Different follicle isolation methods (mechanical and enzymatic) have been developed to obtain pre-antral follicles to seed the cultures. The isolation method is chosen taking into account the characteristics of specie selected to be cultured. There are pros and cons associated with each isolation method. In general, mechanical isolation keeps the structure of the follicle intact but the number of follicles obtained could be lower than using enzymatic methods [46]. On the other hand, enzymatic methods permit a greater number of follicles but can induce cell damage which may compromise the subsequent culture [50,51,60].

Different protocols have been described to culture follicles, in summary we can separate them into those that culture ovarian pieces and those that culture isolated primordial follicles (reviewed by [48,57]). Ovarian tissue culture has been conducted for a number of species (mouse, cattle, baboon, monkey and human) over varying time of culture, culture media and supplements, but definitely the best result were obtained in mice [46,54,61–63].

The first live mouse pup from cultured follicles was described by Epigg and O'Brien [60] using a two steps protocol. Authors took mouse ovaries and cultivated them for eight days, after that they

enzymatically disaggregated the ovary and obtained isolated preantral follicles. These preantral follicles were further cultivated for another 14 days. This method was successful in part because the characteristics of the development of the mouse make it possible: mouse follicles are formed a few days after birth and the numbers of follicles and the stage of development are very similar among all the follicles. In fact, nowadays the mouse is the only specie that allows the progression of primordial follicle to a competent oocyte *in vitro* (reviewed by [57]). Using this method, follicles may remain viable and morphologically normal for up to three weeks in culture. Furthermore, multilayer pre-antral follicles have been isolated following the culture of fragments of ovarian cortex [46] or after culture of mouse follicles and ovaries [45,60].

Telfer *et al.* [46] cultured stroma-free small human ovarian cortex slices containing only primordial follicles. After six days of culture in serum-free medium, they observed pre-antral follicles. After that, obtained pre-antral follicles were cultured for four days more in an Activin A supplemented medium. Follicles treated with Activin displayed normal morphology, intact oocytes and antral formation. Authors demonstrated that with an adequate supplement, human primordial follicles could progress to pre-antral follicles [45]

Many protocols have used isolated primordial follicles from multiple species to seed the culture (to mention some of the first ones in different species see pig [64], bovine [65] and humans [66,67]). In most culture conditions, a great number of primordial follicles are viable following extraction but after 24 h they rapidly lose their three dimensional structure: the follicles collapse, the pre-granulosa cells migrate away from the follicle and oocyte degenerate [43,68]. A more recent study described a reproducible two-step culture method for isolated mouse primordial follicles [69]. Isolated follicles were cultured for six days, avoiding the theca cell to attach to the culture surface. After these six days of culture, attachment of theca cells was allowed and follicles were cultured for another 12 days. Authors described an average meiotic maturation, as defined by oocytes being able to mature to metaphase II after appropriate hormonal stimulation. Nevertheless, estrogen secretion was lower than that obtained from pre-antral cultured follicles.

Finally, many efforts have been applied to culture pre-antral follicles either obtained from fresh tissues or from some of the culture techniques mentioned above. Pre-antral follicle culture methods can be divided into those that allow follicle attachment, thus losing the architecture of the follicle [43,44] or those culture systems that maintain tridimensional follicle integrity. Three dimensional methods (3D) maintain the architecture of the follicle and they usually use serum-free medium [46,51,62], hydrophobic membranes [70] or a collagen matrix [71,72] or alginate gels to encapsulate the follicles [73,74]. In general, all these methods allow rodent follicles to reach mid-pre-antral sized follicles after six days. Rodent follicles cultured with 3D methods have apparently normal morphology and steroid production [68–70], respond to exogenous ovulatory stimulus [75] and the obtained oocytes could be fertilized [68].

Pre-antral follicle culture has also permitted the successful *in vitro* development of follicles obtained from either fresh [43] and cryopreserved tissues [76–78]. Follicles obtained from cultures that used an attachment IVG method, showed an oocyte diameter, chromatin configuration, transcriptional activity and meiotic competence similar to those seen *in vivo* [79]. 3D IVG methods originated for the culture of mouse pre-antral follicles [43,50,68,70,71], but also could be applied to follicles from domestic ruminants and human. In these species, the use of extracellular matrices to support the



architecture of follicles in inert alginate hydrogels has been shown to be a good option. The alginate matrix mimics the stromal microenvironment of the ovary and is a good support to the growth and maturation of multilayered secondary follicles in pigs, cattle, ruminants, primates and humans [76,80–86]. Early reports demonstrated that murine follicles grown in alginate capsules reached the sizes observed *in vivo* [81,87]. Extended growth, coordinated differentiation of follicular cell types, antral cavity formation, theca cell differentiation, oocyte maturation and hormone production were described in 3D methods for mouse, monkey and human (reviewed by [57]). Nonetheless, the quality of the oocytes derived from follicles with accelerated growth rates needs to be fully verified, especially before these systems can be considered for clinical use.

Nevertheless, in most of these reports, meiotic progression is not directly evaluated and the progression in culture is related to the specie. Only in mouse is it possible to obtain a live pup from a primordial follicle, in the other cases the outcome depends on the stage of the follicle at the start of the culture.

## 6. Conclusions

The study of mammalian meiosis is a crucial topic to understand the basis of human infertility and aneuploidy origin. However, due to the shortage of samples and the impossibility to manipulate human gonads, studies in humans are scarce. Therefore, most knowledge obtained until today comes from the study of model organisms, like mouse, that permit genetic manipulations. Nevertheless, as discussed before, generating genetically engineered mice involves time and substantial costs to create and maintain the line. Thus, achieving a culture technique that would allow meiotic progression *in vitro* could be a very useful tool to study mammalian meiosis. Not only would it permit the manipulation of the human meiotic process and thus to test hypotheses that for the moment cannot be tested, but also it could complement the *in vivo* studies performed in mutant mice. For instance, a meiotic culture could enable the study of synapsis progression live under the microscope. Also, a synchronic culture could be a very powerful tool to study certain meiotic processes from a biochemical point of view, to mention some of the multiple possibilities that such a technique could offer. Meiotic culturing is already being used to test the genotoxicity of physical and chemical agents on spermatogenesis [29,34] or oogenesis [88].

Some of the results obtained to date are promising and, although most culture techniques are far from being a ready-to-use protocol for many labs, it is exciting to see a future in which protocols to culture mammalian sperm or oocytes precursor cells will be a common and useful instrument for the study of gametogenesis and meiosis.

## Acknowledgements

MAEB has a fellowship from the Ministry of Foreign Affairs and Cooperation (AECI, Spain) (#0000447445) and the National Council of Science and Technology (CONACYT, México) (#166825). This work was funded by a grant from CIDEM (Catalan Government), VALTEC09-1-0007.

## References

1. Hassold, T.; Hunt, P. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 280–291.
2. Ginsburg, M.; Snow, M.H.; McLaren, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* **1990**, *110*, 521–528.
3. Lawson, K.A.; Hage, W.J. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found. Symp.* **1994**, *182*, 68–84, discussion 84–91.
4. Chuma, S.; Nakatsuji, N. Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells *in vitro* and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev. Biol.* **2001**, *229*, 468–479.
5. McLaren, A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* **2003**, *262*, 1–15.
6. Lin, Y.; Gill, M.E.; Koubova, J.; Page, D.C. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* **2008**, *322*, 1685–1687.
7. Bowles, J.; Knight, D.; Smith, C.; Wilhelm, D.; Richman, J.; Mamiya, S.; Yashiro, K.; Chawengsaksophak, K.; Wilson, M.J.; Rossant, J.; Hamada, H.; Koopman, P. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* **2006**, *312*, 596–600.
8. Koubova, J.; Menke, D.B.; Zhou, Q.; Capel, B.; Griswold, M.D.; Page, D.C. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2474–2479.
9. Hunt, P.A.; Hassold, T. Sex matters in meiosis. *Science* **2002**, *296*, 2181–2183.
10. Morelli, M.A.; Cohen, P.E. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* **2005**, *130*, 761–781.
11. Geijsen, N.; Horoschak, M.; Kim, K.; Gribnau, J.; Eggan, K.; Daley, G.Q. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* **2004**, *427*, 148–154.
12. Nayernia, K.; Nolte, J.; Michelmann, H.W.; Lee, J.H.; Rathsack, K.; Drusenheimer, N.; Dev, A.; Wulf, G.; Ehrmann, I.E.; Elliott, D.J.; Okpanyi, V.; Zechner, U.; Haaf, T.; Meinhardt, A.; Engel, W. *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev. Cell* **2006**, *11*, 125–132.
13. Toyooka, Y.; Tsunekawa, N.; Akasu, R.; Noce, T., Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11457–11462.
14. Clark, A.T.; Bodnar, M.S.; Fox, M.; Rodriguez, R.T.; Abeyta, M.J.; Firpo, M.T.; Pera, R.A. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 727–739.
15. Saiti, D.; Lacham-Kaplan, O. Mouse Germ Cell Development *in-vivo* and *in-vitro*. *Biomark Insights* **2007**, *2*, 241–252.
16. Lawson, K.A.; Dunn, N.R.; Roelen, B.A.; Zeinstra, L.M.; Davis, A.M.; Wright, C.V.; Korving, J.P.; Hogan, B.L. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 424–436.
17. Ying, Y.; Liu, X.M.; Marble, A.; Lawson, K.A.; Zhao, G.Q. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 1053–1063.

18. Kee, K.; Gonsalves, J.M.; Clark, A.T.; Pera, R.A. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **2006**, *15*, 831–837.
19. Nayernia, K.; Lee, J.H.; Drusenheimer, N.; Nolte, J.; Wulf, G.; Dressel, R.; Gromoll, J.; Engel, W. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab. Invest.; J. Tech. Meth. Pathol.* **2006**, *86*, 654–663.
20. Kee, K.; Angeles, V.T.; Flores, M.; Nguyen, H.N.; Reijo Pera, R.A. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* **2009**, *462*, 222–225.
21. Hubner, K.; Fuhrmann, G.; Christenson, L.K.; Kehler, J.; Reinbold, R.; De La Fuente, R.; Wood, J.; Strauss, J.F., III; Boiani, M.; Scholer, H.R. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* **2003**, *300*, 1251–1256.
22. Lacham-Kaplan, O.; Chy, H.; Trounson, A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* **2006**, *24*, 266–273.
23. Novak, I.; Lightfoot, D.A.; Wang, H.; Eriksson, A.; Mahdy, E.; Hoog, C. Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* **2006**, *24*, 1931–1936.
24. Qing, T.; Shi, Y.; Qin, H.; Ye, X.; Wei, W.; Liu, H.; Ding, M.; Deng, H. Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation* **2007**, *75*, 902–911.
25. Kerkis, A.; Fonseca, S.A.; Serafim, R.C.; Lavagnolli, T.M.; Abdelmassih, S.; Abdelmassih, R.; Kerkis, I. *In vitro* differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells* **2007**, *9*, 535–548.
26. Salvador, L.M.; Silva, C.P.; Kostetskii, I.; Radice, G.L.; Strauss, J.F., III. The promoter of the oocyte-specific gene, Gdf9, is active in population of cultured mouse embryonic stem cells with an oocyte-like phenotype. *Methods* **2008**, *45*, 172–181.
27. Hue, D.; Staub, C.; Perrard-Sapori, M.H.; Weiss, M.; Nicolle, J.C.; Vigier, M.; Durand, P. Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* **1998**, *59*, 379–387.
28. Perrard, M.H.; Hue, D.; Staub, C.; Le Vern, Y.; Kerboeuf, D.; Durand, P. Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the *in vivo* situation and under *in vitro* conditions. *Mol. Reprod. Dev.* **2003**, *65*, 86–95.
29. Perrin, J.; Lussato, D.; de Meo, M.; Durand, P.; Grillo, J.M.; Guichaoua, M.R.; Botta, A.; Berge-Lefranc, J.L. Evolution of DNA strand-breaks in cultured spermatocytes: the Comet Assay reveals differences in normal and gamma-irradiated germ cells. *Toxicol. In Vitro* **2007**, *21*, 81–89.
30. Staub, C.; Hue, D.; Nicolle, J.C.; Perrard-Sapori, M.H.; Segretain, D.; Durand, P. The whole meiotic process can occur *in vitro* in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp. Cell Res.* **2000**, *260*, 85–95.
31. Weiss, M.; Vigier, M.; Hue, D.; Perrard-Sapori, M.H.; Marret, C.; Avallet, O.; Durand, P. Pre- and postmeiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **1997**, *57*, 68–76.

32. Feng, L.X.; Chen, Y.; Dettin, L.; Pera, R.A.; Herr, J.C.; Goldberg, E.; Dym, M. Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* **2002**, *297*, 392–395.
33. Lee, J.H.; Gye, M.C.; Choi, K.W.; Hong, J.Y.; Lee, Y.B.; Park, D.W.; Lee, S.J.; Min, C.K. *In vitro* differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil. Steril.* **2007**, *87*, 824–833.
34. Geoffroy-Siraudin, C.; Perrard, M.H.; Chaspoul, F.; Lanteaume, A.; Gallice, P.; Durand, P.; Guichaoua, M.R. Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a suitable system for studying toxicant impact on meiosis effect of hexavalent chromium. *Toxicol. Sci.* **2010**, *116*, 286–296.
35. Blandau, R.J. Observations on living oogonia and oocytes from human embryonic and fetal ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1969**, *104*, 310–319.
36. Zhang, J.; Liu, J.; Xu, K.P.; Liu, B.; DiMattina, M. Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. *J. Assist. Reprod. Genet.* **1995**, *12*, 361–368.
37. Hartshorne, G.M.; Barlow, A.L.; Child, T.J.; Barlow, D.H.; Hulten, M.A. Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture. *Hum. Reprod.* **1999**, *14*, 172–182.
38. Lyrakou, S.; Hulten, M.A.; Hartshorne, G.M. Growth factors promote meiosis in mouse fetal ovaries *in vitro*. *Mol. Hum. Reprod.* **2002**, *8*, 906–911.
39. Roig, I.; Garcia, R.; Robles, P.; Cortvrindt, R.; Egozcue, J.; Smitz, J.; Garcia, M. Human fetal ovarian culture permits meiotic progression and chromosome pairing process. *Hum. Reprod.* **2006**, *21*, 1359–1367.
40. Brieno-Enriquez, M.A.; Robles, P.; Garcia-Cruz, R.; Roig, I.; Cabero, L.; Martinez, F.; Garcia Caldes, M. A new culture technique that allows *in vitro* meiotic prophase development of fetal human oocytes. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 74–84.
41. Smitz, J.E.; Cortvrindt, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction* **2002**, *123*, 185–202.
42. Pacheco, S. Cell Biology, Physiology and Immunology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain. Unpublished work, 2010.
43. Cortvrindt, R.; Smitz, J.; van Steirteghem, A.C. *In-vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum. Reprod.* **1996**, *11*, 2656–2566.
44. Eppig, J.J.; Schroeder, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.* **1989**, *41*, 268–276.
45. Muruvi, W.; Picton, H.M.; Rodway, R.G.; Joyce, I.M. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. *Theriogenology* **2005**, *64*, 1357–1370.
46. Telfer, E.E.; McLaughlin, M.; Ding, C.; Thong, K.J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum. Reprod.* **2008**, *23*, 1151–1158.
47. Adriaens, I.; Cortvrindt, R.; Smitz, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Hum. Reprod.* **2004**, *19*, 398–408.

48. Picton, H.M.; Harris, S.E.; Muruvi, W.; Chambers, E.L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction* **2008**, *136*, 703–715.
49. Hulshof, S.C.; Figueiredo, J.R.; Beckers, J.F.; Bevers, M.M.; van der Donk, J.A.; van den Hurk, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17beta-estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology* **1995**, *44*, 217–226.
50. Eppig, J.J.; O'Brien, M.J. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology* **1998**, *49*, 415–422.
51. Newton, H.; Picton, H.; Gosden, R.G. *In vitro* growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J. Reprod. Fertil.* **1999**, *115*, 141–150.
52. Schmidt, K.L.; Ernst, E.; Byskov, A.G.; Nyboe Andersen, A.; Yding Andersen, C. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum. Reprod.* **2003**, *18*, 2654–2659.
53. Lucci, C.M.; Kacinskis, M.A.; Lopes, L.H.; Rumpf, R.; Bao, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology* **2004**, *61*, 1101–1114.
54. Hovatta, O.; Wright, C.; Krausz, T.; Hardy, K.; Winston, R.M. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum. Reprod.* **1999**, *14*, 2519–2524.
55. Scott, J.E.; Zhang, P.; Hovatta, O. Benefits of 8-bromo-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-br-cGMP) in human ovarian cortical tissue culture. *Reprod. Biomed. Online* **2004**, *8*, 319–324.
56. Hu, Y.; Betzendahl, I.; Cortvrindt, R.; Smitz, J.; Eichenlaub-Ritter, U. Effects of low O<sub>2</sub> and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum. Reprod.* **2001**, *16*, 737–748.
57. Smitz, J.; Dolmans, M.M.; Donnez, J.; Fortune, J.E.; Hovatta, O.; Jewgenow, K.; Picton, H.M.; Plancha, C.; Shea, L.D.; Stouffer, R.L.; Telfer, E.E.; Woodruff, T.K.; Zelinski, M.B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum. Reprod. Update* **2010**, *16*, 395–414.
58. Carambula, S.F.; Goncalves, P.B.; Costa, L.F.; Figueiredo, J.R.; Wheeler, M.B.; Neves, J.P.; Mondadori, R.G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. *Theriogenology* **1999**, *52*, 563–571.
59. Figueiredo, J.R.; Hulshof, S.C.; Van den Hurk, R.; Ectors, F.J.; Fontes, R.S.; Nusgens, B.; Bevers, M.M.; Beckers, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology* **1993**, *40*, 789–799.
60. Eppig, J.J.; O'Brien, M.J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* **1996**, *54*, 197–207.
61. Wright, C.S.; Hovatta, O.; Margara, R.; Trew, G.; Winston, R.M.; Franks, S.; Hardy, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in-vitro* growth of human ovarian follicles. *Hum. Reprod.* **1999**, *14*, 1555–1562.

62. Picton, H.M.; Campbell, B.K.; Hunter, M.G. Maintenance of oestradiol production and expression of cytochrome P450 aromatase enzyme mRNA in long-term serum-free cultures of pig granulosa cells. *J. Reprod. Fertil.* **1999**, *115*, 67–77.
63. Webber, L.J.; Stubbs, S.A.; Stark, J.; Margara, R.A.; Trew, G.H.; Lavery, S.A.; Hardy, K.; Franks, S. Prolonged survival in culture of preantral follicles from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 1975–1978.
64. Greenwald, G.S.; Moor, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J. Reprod. Fertil.* **1989**, *87*, 561–571.
65. Gigli, I.; Byrd, D.D.; Fortune, J.E. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles *in vitro*. *Theriogenology* **2006**, *66*, 344–353.
66. Abir, R.; Roizman, P.; Fisch, B.; Nitke, S.; Okon, E.; Orvieto, R.; Ben R.Z. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum. Reprod.* **1999**, *14*, 1299–1301.
67. Oktay, K.; Nugent, D.; Newton, H.; Salha, O.; Chatterjee, P.; Gosden, R.G. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* **1997**, *67*, 481–486.
68. Spears, N. *In-vitro* growth of oocytes. *In-vitro* growth of ovarian oocytes. *Hum. Reprod.* **1994**, *9*, 969–970.
69. Lenie, S.; Cortvrindt, R.; Adriaenssens, T.; Smits, J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biol. Reprod.* **2004**, *71*, 1730–1738.
70. Nayudu, P.L.; Osborn, S.M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* **1992**, *95*, 349–362.
71. Carroll, R.S.; Corrigan, A.Z.; Vale, W.; Chin, W.W. Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* **1991**, *129*, 1721–1726.
72. Hirao, Y.; Nagai, T.; Kubo, M.; Miyano, T.; Miyake, M.; Kato, S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* **1994**, *100*, 333–339.
73. West, E.R.; Xu, M.; Woodruff, T.K.; Shea, L.D. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4439–4448.
74. Xu, M.; Kreeger, P.K.; Shea, L.D.; Woodruff, T.K. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 2739–2746.
75. Rose, U.M.; Hanssen, R.G.; Kloosterboer, H.J. Development and characterization of an *in vitro* ovulation model using mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 503–511.
76. Newton, H.; Illingworth, P. *In-vitro* growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. *Hum. Reprod.* **2001**, *16*, 423–429.
77. Sadeu, J.C.; Cortvrindt, R.; Ron-El, R.; Kasterstein, E.; Smits, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil. Steril.* **2006**, *85*, 1130–1141.
78. Smits, J.; Cortvrindt, R. Follicle culture after ovarian cryostorage. *Maturitas* **1998**, *30*, 171–179.
79. Pesty, A.; Miyara, F.; Debey, P.; Lefevre, B.; Poirot, C. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth *in vitro*. *Mol. Hum. Reprod.* **2007**, *13*, 3–9.

80. Gutierrez, C.G.; Ralph, J.H.; Telfer, E.E.; Wilmut, I.; Webb, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. *Biol. Reprod.* **2000**, *62*, 1322–1328.
81. Kreeger, P.K.; Deck, J.W.; Woodruff, T.K.; Shea, L.D. The *in vitro* regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials* **2006**, *27*, 714–723.
82. McCaffery, F.H.; Leask, R.; Riley, S.C.; Telfer, E.E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol. Reprod.* **2000**, *63*, 267–273.
83. Picton, H.M.; Danfour, M.A.; Harris, S.E.; Chambers, E.L.; Huntriss, J. Growth and maturation of oocytes *in vitro*. *Reprod. Suppl.* **2003**, *61*, 445–462.
84. Thomas, F.H.; Campbell, B.K.; Armstrong, D.G.; Telfer, E.E. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development *in vitro*. *Reproduction* **2007**, *133*, 1121–1128.
85. Thomas, F.H.; Leask, R.; Srsen, V.; Riley, S.C.; Spears, N.; Telfer, E.E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction* **2001**, *122*, 487–495.
86. Xu, M.; West-Farrell, E.R.; Stouffer, R.L.; Shea, L.D.; Woodruff, T.K.; Zelinski, M.B. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biol. Reprod.* **2009**, *81*, 587–594.
87. Pangas, S.A.; Saudye, H.; Shea, L.D.; Woodruff, T.K. Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell-oocyte complexes. *Tissue Eng.* **2003**, *9*, 1013–1021.
88. Brieno-Enriquez, M.A.; Garcia Caldes, M. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Unpublished data, 2010.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).





## **4.2. RESULTADOS DEL SEGUNDO OBJETIVO ESPECÍFICO**

Artículo 2

**“Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposition during *in vitro* human oocyte development”**

(Submitted, Human Reproduction HR-11-00524)



**HUMAN MEIOTIC PROGRESSION and RECOMBINATION ARE AFFECTED by BISPHENOL A EXPOSITION DURING *IN VITRO* HUMAN OOCYTE DEVELOPMENT.**

**Running head: BPA disrupts human meiotic prophase**

Brieño-Enríquez MA <sup>1,2</sup>, Robles P <sup>3</sup>, Camats-Tarruella N <sup>4</sup>, García-Cruz R <sup>1</sup>, Roig I <sup>1</sup>, Cabero L <sup>5</sup>,  
Martínez F <sup>2</sup>, Garcia Caldes M <sup>1,6</sup>.

1. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain.
2. Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México.
3. Department of Genetics, Harvard Medical School (HMS).  
Boston, Massachusetts, USA.
4. Unitat de Recerca en Endocrinologia Pediàtrica,  
Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón (IR-HUVH)  
CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras).  
Barcelona, Spain.
5. Departament de Ginecologia i Obstetricia, Hospital de la Vall d'Hebron. Barcelona, Spain.
6. Corresponding author: phone: +34 935811905; Fax: +34 935811025;  
e-mail: montserrat.garcia.caldes@uab.es

## Abstract

Bisphenol A (BPA) is a “weak” endocrinal disruptor. The effect of BPA on human reproduction is controversial but has been related to meiotic anomalies, recurrent miscarriages and abnormal karyotypes. To evaluate the effects of BPA on oocyte survival, pairing-synapsis and meiotic recombination in cultured human oocytes, 21,510 *in vitro* cultured oocytes from 12 fetal ovaries were analyzed. Ovaries were cultured for seven, fourteen or twenty-one days in control medium, DMSO-medium, BPA-medium and E<sub>2</sub>-medium. Meiotic pairing-synapsis and recombination were studied by immunofluorescence against lateral element protein (SYCP3), central element protein (SYCP1) of the synaptonemal complex and chromosome axis cohesin REC8. Mismatch repair protein MLH1 was used as a crossover marker. Meiotic progression was analyzed following the number of surviving oocytes at different meiotic stages found in each culture time and condition, and the total number of MLH1 *foci* found in oocytes from cultured ovaries.

Oocyte survival *in vitro* decreased with the addition of BPA to the medium (1μM or greater). Oocyte degeneration was up to 5 times higher when BPA was added to culture medium. Moreover, oocytes exposed to BPA concentrations of 10μM or higher presented approximately 2 times more MLH1 *foci* than unexposed cultured oocytes (p=0.01). This fact was also observed in chromosome 21 from BPA-exposed oocytes, which doubled the average number of MLH1 *foci* found in control oocytes (p=0.001). Estradiol (E<sub>2</sub>) was used as a positive control of estrogen receptors activity, E<sub>2</sub> addition to the medium had similar effects on meiotic progression of oocytes from cultured ovaries.

Our findings show that BPA concentrations of 1μM or higher decrease the survival of human fetal oocytes *in vitro*, and concentrations of 10μM or higher increase MLH1 *foci* number. These data suggest BPA can act as a toxic substance, with a special incidence on female gametogenesis.

## **Author summary**

A great debate concerning the effects of BPA and the safety of human exposure is on the table of scientists, agencies and expert panels. Previous studies in rodents and worms show the reproductive effects of BPA. These studies show how BPA-exposure during pregnancy disturbs the viability and quality of the oocyte. In this sense, the alteration of oocyte development only could be observed when that fetus reach adulthood. Our results show how in human oocytes, BPA reduces the number of oocytes and increase meiotic recombination. A diminution of oocytes in the fetus could induce an alteration of ovarian reserve as well as a low quality of the oocyte in the adult female. The increment in meiotic recombination rate is related to an alteration of the recombination pattern. The alteration of meiotic recombination could cause segregation abnormalities and increase the possibility of numerical alterations like monosomy or trisomy in the resulting oocytes. So, the effects of BPA-exposure in a pregnant woman could not be reflected on her, but would be observable on her grand-sons because BPA could induce a multigenerational effect.

## Introduction

Bisphenol A (BPA; 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane; CAS# 80-05-7) is one of the highest-volume chemical products produced worldwide [1]. This compound is a plastic monomer and a plasticizer used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins found in metal cans and many other plastic products such as toys, water pipes, drink containers, food packing, eyeglass lenses, sport safety equipment, dental sealants and medical equipment [2, 3]. Human exposure to BPA may occur by workplace-related inhalation during its production [4], but the most common way of exposure is oral intake, derived from migration of the compound from canned beverages, foods and baby bottles, related to the exposure of the plastics to high temperatures during boiling, microwave cooking or autoclaving [5-12].

BPA is considered an endocrinal disruptor with a “weak” estrogenic effect. Biochemical assays have determined that BPA binds to both estrogen receptors, alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ), with an approximately 10-fold-higher affinity to ER $\beta$  [13, 14]. At the same time, BPA binds strongly to the cell-membrane estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) [15, 16].

Toxicology studies have determined that the maximum tolerated dose for BPA is 1000mg/kg body weight per day. The United States Environmental Protection Agency (EPA) and European Food Safety Authority (EFSA) have calculated the reference dose of 0.05mg/kg body-weight per day (EPA) and 0.06mg/kg body-weight per day (EFSA). Reference doses were calculated using a safety factor of 1000 (three safety factors of 10-fold were applied to account for the following: human risk estimated from animal studies; variability within the human population and extrapolation from subchronic to chronic exposures) (Reviewed by Vandenberg et al., 2007; 2009; 2010) [1-3, 16]. Doses below these reference doses are considered to be low doses. Nevertheless, there is evidence of a BPA biological effect at low doses, as was demonstrated in animals exposed during gestation or lactation [3, 17].

Studies of the possible reproductive health effects of BPA on humans are limited, but they have associated BPA exposure with obesity, endometrial hyperplasia, recurrent miscarriages, abnormal karyotypes and polycystic ovarian syndrome [18-21].

The effects of BPA on ovary and uterus gene expression are multiple. It modulates genes

involved in cell growth, response to stress, differentiation, apoptosis and DNA repair [22-28]. BPA can cross the placental barrier [29], as was confirmed by finding BPA in human amniotic fluid, fetal plasma and the placenta [27-30]. Since fetuses have an immature hepatic metabolism, fetal exposure could increase the toxic effect of BPA on all organs, including the ovary [29-34].

Around weeks 20 to 24 of gestation, the maximal population of oocytes at the ovary is observed (6.8 million). Around the 11<sup>th</sup> to 13<sup>th</sup> weeks of gestation, oocytes initiate meiosis [35]. Meiosis is the special cell division characterized by the reductional division of the genome, generating haploid cells after two successive cell divisions following one round of DNA replication. In females this process begins *in utero* and concludes only if the oocyte is fertilized. During the fetal period, the first meiotic prophase occurs and from there oocytes remain arrested at dictyonema for years or decades. During the meiotic prophase, pairing-synapsis and recombination of homologous chromosomes occur. Double-strand breaks are generated along the genome, which initiates those processes. These breaks are repaired by homologous recombination either as crossovers (COs, when the DSB-flanking regions are exchanged between the homologs) or as non-crossovers (NCOs, when no exchange happens between the homologs). Cytologically CO can be visualized by the deposition of the mismatch repair protein MLH1 (See review, Hoffmann and Borts, 2004) [36].

BPA exposure to ovaries, and thus to developing oocytes, could affect the development of meiotic prophase. The perturbation of this process would undoubtedly be reflected during the reproductive lifespan of the individual. The effect of BPA on mammalian oocytes can be analyzed at early stages of meiosis (those stages that occur *in utero*) and late stages (conclusion of first and second meiotic division, post-puberty). Effects of BPA on late-stage oocytes are: *In vitro* exposed cumulus-enclosed mouse oocytes showed a dose-response retardation to reach metaphase I, telophase I arrest, elongation of the spindle, dispersion of pericentriolar material at metaphase II and chromosome failure to congress at spindle and incapacity to resume meiosis. Mouse oocytes exposed *in vitro* or during fetal development to BPA fail to properly align chromosomes at the spindle equator at metaphase II, present unbalanced chromosome sets and conceptions using exposed oocytes are more prone to miscarriage than non-exposed oocytes [37-41]. At the same

time, BPA seems to affect the maturation of the mouse germinal vesicle by disturbing the entry of calcium into the oocyte [42].

However, little is known about BPA's effect on early oocytes [43, 44]. Studies performed on mouse fetal oocytes have concluded that BPA affects synapsis and meiotic recombination. BPA-exposed oocytes showed synaptic defects like end-to-end chromosome associations and incomplete synapsis [43, 44]. Moreover, these oocytes also showed increased levels of the total MLH1 *foci* and chiasmata. Authors have reported a significant increase of the MLH1 *foci* number in 155 oocytes from BPA-exposed mice, when compared to 124 oocytes from control mice. The increments of the MLH1 *foci* number and chiasmata seem to be related to ER $\beta$ , since in ER $\beta$  knockout oocytes, recombination mimics the alterations observed in BPA-exposed animals [43, 44]. Therefore, the authors suggested that BPA acts as an ER $\beta$  antagonist.

A more recently study performed in *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) shows that BPA induces sterility, reducing the number of viable oocytes and increasing embryo lethality as well as impairing chromosome synapsis and disruption of double-strand breaks repair progression. The authors have also described that BPA exposure results in impaired chromosome segregation during metaphase [45].

The main objective of this *in vitro* study was to evaluate the possible effects of BPA on meiotic prophase in human fetal oocytes from cultured ovaries for the first time. Estradiol (E<sub>2</sub>) was used as positive control of ER activity. Survival and meiotic progression were evaluated following the number of degenerated oocytes and the percentage of oocytes found in each sub-stage of meiotic prophase respectively. Immunofluorescence (IF) against lateral element protein 3 (SYCP3), central element protein (SYCP1) of synaptonemal complex and cohesin REC8 was performed to evaluate pairing and synapsis. Meiotic recombination was analyzed by IF following mismatch repair protein MLH1, used as a crossover marker.



## Results

A total of 21,510 oocytes from 12 cultured ovaries were analyzed: 17,105 oocytes to evaluate the effects on meiotic progression and survival of the oocytes and 4,405 for meiotic recombination. Oocytes at meiotic prophase were found at all culture times in all biological samples used (Table S1). To evaluate pairing-synapsis, two different slides for culture time and culture medium were used, and an independent slide was used for meiotic recombination analysis (Figure 1). No statistical differences in any sample ( $p=0.55$ ) or inter-sample repeat ( $p=0.78$ ) were found.

### Bisphenol A decreases oocyte survival

Firstly, the effect of BPA was evaluated on the survival of cultured oocytes. Oocyte survival was evaluated according to the number of degenerated oocytes found for each culture condition. Degenerated oocytes were identified by immunofluorescence; oocytes classified as degenerated showed a contracted and deformed nucleus in the presence of the lateral (SYCP3) and central element (SYCP1) of synaptonemal complex protein. The presence of SC proteins confirmed the evaluated cell as an oocyte (Figure S1).

DMSO-supplemented medium did not have a significant effect on the survival of oocytes at T7 or T14 ( $p \geq 0.05$ ) (Figure S2 and Table S2). Nevertheless, a significant increase of 2.6% of degenerated oocytes was observed at T21 in cultures treated with DMSO-supplemented medium ( $p=0.01$ ).

Ovaries cultured with BPA, independently of the concentration applied, showed an increment of degenerated oocytes from 3.1% to 15.0%, as compared to control at T7 ( $p=0.001$ ), at T14, from 4.9% to 19.9% and from 6.6% to 27.0% at T21, all of them being significantly different ( $p=0.001$ ) (Figure 2A, Figure 2 and Table S2).

For ovaries cultured with  $E_2$ -supplemented medium, reduction of cell viability was observed in all of the concentrations applied. The increment of degenerated oocytes varied from 2.3% to 14.0% more than for the control at T7; at T14 it went from 3.9% to 19.6% and at T21 the increment rose from 5.7% to 27.1%, all of them with statistical differences, when compared to control ( $p=0.001$ ) (Figure 2A, Figure S2 and Table S3).

## Bisphenol A disrupts meiotic progression

Previous studies performed on mice and *C. elegans* have suggested that BPA could affect the evolution of synapsis, [43-45] so it was decided to monitor it, using IF against proteins REC8, SYCP3 and SYCP1. The pairing-synapsis was evaluated following the correct alignment and synapsis of the homolog chromosomes along the different culture times (Figure S1). Meiotic progression was analyzed by measuring the percentage of oocytes found in each sub-stage of meiotic prophase during culture (Table S3, Table S4 and Table S5). Degenerated oocytes were not included in order to calculate the percentages of the sub-stages. Different levels of meiotic progression were found among the different media used.

Ovaries cultured with DMSO-supplemented medium did not show any changes in the percentage of oocytes at leptotema, when compared with control at any of the culture times ( $p \geq 0.05$ ) (Figure S3 and Table S3). Oocytes from ovaries cultured with BPA-supplemented medium showed a non-significant increase at T7 ( $p \geq 0.05$ ). At T14, ovaries cultured with concentrations equal to or higher than  $10 \mu\text{M}$  BPA showed a significant increment, going from 6.0% to 12.3% oocytes at leptotema ( $p \leq 0.05$ ). In contrast, at T21 significant increments of oocytes at leptotema were observed, even with the lowest concentrations ( $1 \mu\text{M}$ ). Increments of oocytes at leptotema at T21 varied from 5.6% to 22.4% more oocytes than did the control ( $p=0.01$ ) (Figure 2B, Figure S3 and Table S3).

At T7 and T14, oocytes from ovaries cultured with  $\text{E}_2$ -supplemented medium showed an increment of oocytes at leptotema without statistical differences ( $p \geq 0.05$ ). At T21, a significant increment of oocytes at leptotema was observed for all  $\text{E}_2$  concentrations used. The range of increment observed was from 4.6% to 9.3% ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 2B, Figure S3 and Table S3).

The percentage of oocytes at zygotema from cultured ovaries did not show significant differences among control and the rest of the culture media used (Figure S4 and Table S4) ( $p \geq 0.05$ ).

A significant reduction of the percentage of oocytes at pachynema was observed with all of the concentrations of BPA used and culture times (Figure 2C, Figure S5 and Table S5). At T7, the reduction of the percentage of oocytes at pachynema went from 3.2% to 5.2%, at T14 it rose from

6.7% to 14.3% and at T21 it went from 6.5% to 19.8%, all differences being statistically significant (all of them  $p \leq 0.01$ ) (Figure 2C, Figure S5 and Table S5).

Ovaries cultured with  $E_2$ -supplemented medium showed a non-significant decrease in the percentage of pachynema oocytes at T7 ( $p \geq 0.05$ ), statistical differences only being observed in those treated with  $E_2$  5nM ( $p = 0.01$ ). Cultures at T14 and T21 showed a significant reduction in the percentage of oocytes at pachynema for all of the concentrations of  $E_2$ -supplemented medium, when compared to controls ( $p = 0.01$ ) (Figure 2C, Figure S5 and Table S5).

### **Bisphenol A increases the number of MLH1 *foci***

Because BPA exposure to mice causes a significant increase of the number of MHL1 *foci* and chiasmata [43, 44], its effects were analyzed on cultured human fetal oocytes. Meiotic recombination was analyzed following the number of MLH1 *foci* at pachynema (Figure 3A, Figure 4 and Figure S6). All of the oocytes at pachynema, independently of the medium used, showed MLH1 protein *foci* (crossover markers) (Table S6 and Table S7). Oocytes cultured with control medium showed a similar mean *foci* number throughout the culture, with a range from 47.2 (T7) to 50.1 (T21) (Figure S6 and Table 1) ( $p \geq 0.05$ ). The means, as well as the ranges, of MLH1 *foci* found on fresh oocytes, cultured oocytes with control medium and cultured oocytes with DMSO-supplemented medium were not significantly different ( $p \geq 0.05$ ). At T7, oocytes cultured with 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M and 30 $\mu$ M BPA showed an increment of the mean MLH1 *foci* number of 40.3%, 54.8% and 65.5% more than did the control at T7 ( $p = 0.01$ ). At T14, oocytes treated with 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M and 30 $\mu$ M BPA showed an increment of their MLH1 *foci* number of 39.2%, 53.3% and 60.4% more than did the control ( $p \leq 0.05$ ). The increment of MLH1 *foci* at T21 showed the same trend. In these oocytes the mean *foci* number showed a significant increment of 40.3% (10  $\mu$ M BPA), 52.9% (20 $\mu$ M BPA) and 62.0% (30 $\mu$ M BPA), as compared to controls ( $p = 0.01$ ) (Figure 3A, Figure 4 and Table 1).

Oocytes treated with  $E_2$ -supplemented media also showed an increase in the mean MLH1 *foci* number, related to  $E_2$  concentration and culture time. At T7, there were no statistical differences, as compared to control ( $p \geq 0.05$ ). A threshold of increment of MLH1 *foci* was observed at T14 in oocytes treated with 20nM  $E_2$  and 30nM  $E_2$ . Oocytes treated with 20nM  $E_2$  and 30nM  $E_2$

showed a significant increase of 25.9% and 38.4% more MLH1 *foci* than in those of controls ( $p=0.01$ ). Finally, at T21 a significant increment of the MLH1 mean *foci* number was also observed in oocytes treated with 10nM  $E_2$  ( $p=0.01$ ) (Figure 3A Figure 4 and Table 1).

Chromosome 21 is one of the most common chromosomes involved in aneuploidies. Thus, we decided to evaluate the effect of BPA on this chromosome by performing an immunofluorescence (IF) against MLH1 followed by a chromosome 21-specific fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Ninety oocytes pooled from cultures treated with either 20 $\mu$ M BPA or 30 $\mu$ M BPA at T7 were analyzed (no statistical differences were observed among them). Bivalents 21 from BPA-exposed oocytes showed a mean MLH1 *foci* number of 2.2, with a range of 1 to 5. Values observed in oocytes treated with BPA had two times more MLH1 *foci* than did those reported in fresh and cultured oocytes (Figure 3B, Figure 4 and Table S7) [46, 54]. An elevated MLH1 *foci* number could certainly increase the possibilities of non-disjunction and thus lead to chromosome 21 aneuploidy.

## Discussion

This work shows the effect of BPA on human oocytes obtained from cultured fetal ovaries being an alternative to experimental animals. A great debate concerning the effects of BPA and the safety of human exposure is on the table of scientists, agencies and expert panels. The United States Environmental Protection Agency (EPA) and European Food Safety Authority (EFSA) have calculated the reference dose of 0.05mg/kg body-weight per day (EPA) and 0.06mg/kg body-weight per day [1]. According to the values of oral intake established by EPA and EFSA in an adult of 70kg, performing a two boxes pharmaco-kinetic model will correspond to an equivalent of 0.48 $\mu$ M approximately [5, 6]. Studies from the National Nutrition Examination Survey (NHANES) (USA) detected BPA in 92.6% of the 2,517 volunteers, with the concentrations observed in urine ranging from 0.4ng/ml to 149 ng/ml (1.8nM to 2.0 $\mu$ M) [2]. These values could be modified by age, gender, ethnic group, occupation and education [3, 4]. For example, BPA levels in premature infants were 11 times higher than were the values reported in adults [1-4]. The actual consensus for the range of BPA concentrations in pregnant women and fetuses is twice of the values described in adults. In the case of other fluids and tissues associated with pregnancy, such as the amniotic fluid and placenta, the described values were 0.1nM and 1.04 $\mu$ g/g, respectively [1-4, 17, 19]. Recent studies increase the debate about the capacity to concentrate and de-conjugate BPA by the human fetus and placenta [20, 29, 30, 32]. In fact, countries like Canada and Denmark have banned the use of BPA in baby bottles, and next year BPA will be banned in baby bottles in all EU countries. The concentrations used in this study (1 $\mu$ M to 30 $\mu$ M) were similar to previous studies performed on nematodes (100 $\mu$ M to 1Mm) [45], *in vitro* and *in vivo* mammalian samples (20 $\mu$ M/kg body-weight per day) [38-43] as well as serum levels reported in occupational exposure cases (111 $\mu$ g/g Creatinine) [1].

### **Oocyte survival is altered in cultured human fetal ovaries after BPA exposure**

BPA and E<sub>2</sub> negatively affect oocyte survival *in vitro*. We did not observe a threshold for either of the compounds, implying that if it exists, it is at a lower concentration than the ones used in the present study. Results obtained indicate that BPA allows for a lower number of oocytes to reach

pachynema with a higher percentage of degenerated oocytes in culture, as compared to control samples. A similar effect was observed for equipotent concentrations of E<sub>2</sub>. BPA has been implicated in promoting apoptosis, e.g., BPA induces apoptosis in mouse Sertoli cells [47] and embryos [48], and increases apoptosis in a dose-dependent manner on murine ovarian granulosa cells [49, 50]. Activity of BPA in models of acute myeloid leukemia indicates that it is able to induce cell-cycle arrest and caspase-dependent apoptosis beyond the endocrinal disruptor activity [51]. The induction of these apoptotic pathways in fetal oocytes could explain the high index of degenerated oocytes found in culture. Because oocytes cultured with E<sub>2</sub>-supplemented medium also showed an increment in the percentages of degenerated oocytes, we hypothesize that the BPA pro-degenerative effect observed *in vitro* might be related to a tissue-specific, estrogenic receptor-related function [52-56]. Nevertheless, it is still possible that both substances may act on different pathways, leading to the same effect.

#### **Human fetal oocytes from cultured ovaries exposed to BPA showed a delayed meiotic progression *in vitro***

The results herein describe the effect of BPA and E<sub>2</sub> on meiotic prophase progression in oocytes from cultured ovaries. This effect was related to variations of the percentage of oocytes at different sub-stages. The effects of BPA on oocytes from cultured ovaries showed a different pattern depending on the sub-stage analyzed.

As was described, there was an increment in the percentage of oocytes at leptoneuma in relation to culture time and BPA concentration. This phenomenon could be explained, firstly, by the entrance into meiosis of some oogonia as well as an activation of anti-apoptotic pathways in the oocytes by stem cell factor (SCF) added to culture medium [57-59]. In this sense, SCF could affect the mitotic division of oogonia and induce the entry of oogonias into meiosis [50, 59-62]. Secondly, another reason could be related to a possible delay in cell-cycle progression. Cell-cycle delay could induce the inability to reach the next sub-stage, in this way inducing an accumulation of oocytes at leptoneuma, as was observed in *C.elegans* oocytes [45] and mammalian cells at late stages of meiosis [37-41]. The balance of oocytes at zygonema, as occurs *in vivo*, was not informative

enough to draw any conclusions.

The number of oocytes that reached pachynema was lower in oocytes from cultured ovaries with BPA-supplemented medium. In this sense, previous reports in *C. elegans* and mouse described synaptic defects after exposure of fetal oocytes to BPA [37, 43, 45]. Thus, this reduction of oocytes at pachynema could be related to an increase of asynapsis, which in turn could induce retardation or the blocking of the meiotic prophase. Surprisingly, the percentage of degenerated oocytes increased in a proportional manner as the cells at pachynema disappeared. This correlation could suggest that cells at pachynema could be selectively eliminated [45]. However, this idea contradicts the current knowledge of how meiotic checkpoints control female meiosis. Nowadays, it is thought that oocytes that do not meet the standards are eliminated later than pachynema, in particular at dyctionema. This fact could either argue against the observed correlation or suggest the existence of another checkpoint mechanism present in cultured oocytes.

In summary, BPA affects meiotic progression by increasing the percentages of oocytes at leptoneuma and reducing the percentage of oocytes that reach pachynema *in vitro*, independently of the concentration used. We cannot establish a threshold for BPA. Estradiol also showed an alteration in meiotic progression characterized by an increment of oocytes at leptoneuma and a diminution of pachynema oocytes, but E<sub>2</sub> apparently acts in dose-response-time fashion-like activity.

#### **Human fetal oocytes from BPA cultured ovaries showed an altered number of MLH1 foci**

The results described herein reveal the effect of BPA on human meiotic recombination occurring *in vitro*. Meiotic recombination provides a structural basis for the correct segregation of chromosomes. In almost all species, during meiotic recombination, exchanges between the homologous chromosomes result in at least one CO per chromosome arm [63, 64]. In this study, MLH1 was used as a marker to detect CO in human oocytes. Human fetal oocytes from ovaries cultured with BPA concentrations of 10µM or higher showed an elevated MLH1 mean foci number, as compared to fresh oocytes or oocytes from ovaries cultured with control medium. The mean MLH1 foci number of BPA-exposed oocytes was affected by BPA concentration. A threshold of the

BPA effect was observed at concentrations of 10 $\mu$ M BPA. Ovaries cultured with E<sub>2</sub> show a dose-response-time fashion-like activity.

Previous studies revealed the effect of BPA on meiotic recombination in female mice [37, 43, 44, 65]. Susiarjo et al. (2007) described that ER $\beta$  knock-out mice had similar recombination defects as did BPA-exposed oocytes, suggesting that BPA acts in fetal ovaries by antagonizing the cellular responses of estrogen receptor  $\beta$  [43]. In this sense, our results showed an increase of MLH1 *foci* in oocytes treated with BPA as well as in oocytes treated with estradiol, with some important differences: First, oocytes treated with BPA showed a greater number of MLH1 *foci* than did oocytes treated with equipotent concentrations of E<sub>2</sub>. Second, oocytes treated with BPA showed an increase in MLH1 *foci* at early stages of culture. Our results are in agreement with the results of Susiarjo et al. (2007), showing that BPA increases MLH1 *foci* number formation in mammalian oocytes [43]. In this sense, Allard and Colaiácovo (2010) recently have described an alteration of double-strand breaks repair after the exposure of *C. elegans* to BPA [45]. Data provided in both studies [43, 45] suggest that BPA could act as an ER $\beta$  antagonist. So, if BPA acts as an ER $\beta$  antagonist, [43, 45] why did oocytes from E<sub>2</sub> treated ovaries show a similar effect? One interpretation could be that the observed effect caused by BPA exposure was associated with the balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$  induction. ER $\alpha$  and ER $\beta$  are present in the fetal ovary. But, during early development, more ER $\beta$  than ER $\alpha$  is present, until the 20<sup>th</sup> week of gestation, when the presence of ER $\alpha$  substantially increases [66]. In physiological conditions, E<sub>2</sub> preferentially binds to ER $\beta$  in the ovary. Therefore, estrogenic effects in the ovary should be related to ER $\beta$  activation. So, when BPA is present and blocks ER $\beta$ , the balance between the estrogenic receptors is altered and the effects of ER $\alpha$  could be detectable. Therefore the “BPA effect” would be related to ER $\alpha$  activation. When high doses of E<sub>2</sub> are applied, the activation of ER $\alpha$  plus the physiological ER $\beta$  activation would be possible, therefore similar, but not identical effects of BPA could be seen. Thus, under this interpretation, the BPA effect would cause a cellular response, a consequence of the imbalance between estrogenic receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ .

The second way of interpreting our data and relating them to those published would be to relate the observed effect to estrogen-related receptors (ERRs). ERRs are a sub-family of receptors close



to estrogenic receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  [12]. BPA is considered to be a ligand to these receptors, but the activation of them by E<sub>2</sub> is controversial [13-17, 50, 67]. It is formally possible that E<sub>2</sub> could act through the activation of ERRs, altering the balance of estrogenic receptor activation, in this way leading to the observed effect on meiocytes. Thus, we cannot exclude that observed effects could be related by ERRs activation.

Nevertheless, the average MLH1 *foci* increment caused by BPA exposure in human oocytes is significantly higher than the one reported in mouse [37, 43]. It is likely that the different technical approaches used to expose BPA to the animals/cells may have affected these experiments, but it is also likely possible that BPA and E<sub>2</sub> have direct genotoxic effect. Iso et al. (2006) observed the induction of double-strand breaks in MCF cells after exposure to BPA and E<sub>2</sub> [25]. Exposed cells displayed an increase of DSB markers, like  $\gamma$ H2AX which co-localized with other DNA repair proteins like BLM (Bloom helicase). [26] On the other hand, Miyamoto et al. (2006) described that E<sub>2</sub> up-regulated the mismatch repair activity in endometrial cells. Up-regulation of the MLH1 protein in these cells could be related to an increment in cell division and DNA damage [23]. Therefore, it is possible that some of the effect of BPA on human oocytes could be related to its genotoxic activity.

In summary, the data obtained in the present study can be interpreted using the existing model based on the mouse and *C. elegans* data in which BPA is supposed to act as an ER $\beta$  antagonist [37, 43-45]. Nevertheless, other interpretations of the data can also be considered, like BPA having an effect through other receptors, such as ERRs, or the direct genotoxic effect of BPA, which may be, in part, involved in the effect caused by BPA on human cultured oocytes.

Human female gametogenesis starts at the early stages of fetal development and only concludes with fecundation. During this long period of time, oocytes are exposed to many chemical and physical factors. So, what are the possible implications of an increase of degenerated cells and a high number of recombination points in oocytes treated with BPA? A diminution of oocytes in the fetus could cause an alteration of ovarian reserve and quality of the oocyte in the adult female. Our results also describe an increment in the recombination points, and an alteration in the number, or localization, of the recombination pattern could affect the segregation of the homologs and increase the possibility of numerical alterations like monosomy or trisomy [45].

Finally, any alterations in the number of viable oocytes as well as the quality of these oocytes could definitely have major implications for the reproductive lifespan of women, ultimately risking their reproductive capabilities. We believe that more studies should be performed to analyze the effects of BPA on the human fetal ovary and its impact on oogenesis.

## **Material and Methods**

Ovaries were cultured following the fetal human oocytes culture technique described elsewhere (experimental design shown in Figure 1) [46].

### **Biological material**

Twelve ovaries were cultured and analyzed (Table S8). Control medium used was: D-MEM (Gibco BLR) supplemented with 5µg/ml insulin, 5µg/ml transferrin, 5ng/ml selenium, 100ng/ml stem cell factor (SCF) (all from Sigma; Munich, Germany), 100UI/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin (both from Gibco BLR). The oocytes were seeded and cultured for seven (T7), fourteen (T14) or twenty-one days (T21) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (For more details, see on supporting Material and Methods).

### **Culture conditions**

Twelve different culture conditions were studied. Control group (control): Oocytes cultured with control medium. DMSO-supplemented medium (DMSO): To test the influence of DMSO over oocytes, they were cultured with control medium + 0.01% DMSO. BPA-supplemented medium (BPA): Five different concentrations of BPA were added to control medium 1µM, 5µM, 10µM, 20µM and 30 µM BPA. E<sub>2</sub>-supplemented medium (E<sub>2</sub>): β-estradiol (E<sub>2</sub>) was selected as a positive control of steroid hormone action. Five BPA equipotent concentrations of E<sub>2</sub> were added to control medium (1nM, 5nM, 10nM, 20nM and 30nM E<sub>2</sub>).

### **Oocyte preparations, Immunofluorescence and FISH**

Oocyte preparations, immunofluorescence against synaptonemal complex proteins (SYCP3, SYCP1 and REC8) and CO markers (MLH1) and chromosome 21-specific FISH were performed as described elsewhere [46, 68-75] (See supporting Material and Methods for a more detailed description of these published procedures as well as the antibodies and probes used in this study). Stages of prophase *in vitro* are shown in Figure S1.

## **Image analysis and statistics**

See supporting Material and Methods for a detailed description of images and statistical analyses.

**Acknowledgments:** This work would have been impossible without the support of the clinicians and biologists of the Fetal Tissue Bank, Pathology and Gynecology Departments of the Hospital de la Vall d 'Hebron, Barcelona, Spain, as well as all of the members of the Department of Physiology and Pharmacology of the Medicine School of San Luis Potosí, México, and the members of the Unit of Cell Biology and Medical Genetics of the Medicine School of UAB, Barcelona. This manuscript was proofreaded by Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking Instructor of English of Universitat Autònoma de Barcelona.

### **Financial disclosure**

Financial support for this study was provided by grants from the Ministerio de Educación y Cultura (BFU2006-12951) (Spain), CIDEM (ACC16) Generalitat de Catalunya (Spain), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107) (Spain), Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación Internacional (AECI, Spain) (#0000447445), National Council of Science and Technology (CONACYT, México) (#166825), National Council of Public Education (SEP, México) (SEP-2004-COI-4591).

The Ministerio de Educación y Cultura, CIDEM, Ministerio de Asuntos Exteriores y Coperación Internacional, National Council of Science and Technology, and the National Council of Public Education had no role in the design, in data collection and analysis, decision to publish or preparation and interpretation of the manuscript.

## References

1. Vandenberg, L.N., R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, and W.V. Welshons, Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, 2007. 24(2): p. 139-77.
2. Vandenberg, L.N., M.V. Maffini, C. Sonnenschein, B.S. Rubin, and A.M. Soto, Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev*, 2009. 30(1): p. 75-95.
3. Vandenberg, L.N., I. Chahoud, V. Padmanabhan, F.J. Paumgartten, and G. Schoenfelder, Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 118(8): p. 1051-4.
4. Vandenberg, L.N., I. Chahoud, J.J. Heindel, V. Padmanabhan, F.J. Paumgartten, et al., Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 118(8): p. 1055-70.
5. Willhite, C.C., G.L. Ball, and C.J. McLellan, Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2008. 11(2): p. 69-146.
6. Wetherill, Y.B., B.T. Akingbemi, J. Kanno, J.A. McLachlan, A. Nadal, et al., In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*, 2007. 24(2): p. 178-98.
7. Guobing X, J.S., Guohua H, Lixing Z, Tongjun W, Zhijun Z. , Investigation into serum BPA and sex hormone levels of workers in epoxy resin manufacturing. *J. Environ. Occup. Med*, 2005. 22: p. 295-298.
8. Imanaka, M., K. Sasaki, S. Nemoto, E. Ueda, E. Murakami, et al., [Determination of bisphenol A in foods using GC/MS]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2001. 42(2): p. 71-8.
9. Goodson, A., H. Robin, W. Summerfield, and I. Cooper, Migration of bisphenol A from can coatings--effects of damage, storage conditions and heating. *Food Addit Contam*, 2004. 21(10): p. 1015-26.
10. Onn Wong, K., L. Woon Leo, and H. Leng Seah, Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles. *Food Addit Contam*, 2005. 22(3): p. 280-8.
11. Biles, J.E., K.D. White, T.P. McNeal, and T.H. Begley, Determination of the diglycidyl ether of bisphenol A and its derivatives in canned foods. *J Agric Food Chem*, 1999. 47(5): p. 1965-9.
12. Chapin, R.E., J. Adams, K. Boekelheide, L.E. Gray, Jr., S.W. Hayward, et al., NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2008. 83(3): p. 157-395.
13. Pennie, W.D., T.C. Aldridge, and A.N. Brooks, Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements. *J Endocrinol*, 1998. 158(3): p. R11-4.
14. Kuiper, G.G., P.J. Shughrue, I. Merchenthaler, and J.A. Gustafsson, The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 1998. 19(4): p. 253-86.
15. Horard, B. and J.M. Vanacker, Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand. *J Mol Endocrinol*, 2003. 31(3): p. 349-57.
16. Okada, H., T. Tokunaga, X. Liu, S. Takayanagi, A. Matsushima, et al., Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect*, 2008. 116(1): p. 32-8.
17. Alonso, A., R. Fernandez, P. Ordonez, M. Moreno, A.M. Patterson, et al., Regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in pregnant and estradiol treated rats. *Steroids*, 2006. 71(13-14): p. 1052-61.
18. Takeuchi, T. and O. Tsutsumi, Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 291(1): p. 76-8.
19. Takeuchi, T., O. Tsutsumi, Y. Ikezuki, Y. Takai, and Y. Taketani, Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J*, 2004. 51(2): p. 165-9.

20. Sugiura-Ogasawara, M., Y. Ozaki, S. Sonta, T. Makino, and K. Suzumori, Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*, 2005. 20(8): p. 2325-9.
21. Yang, M., M.S. Park, and H.S. Lee, Endocrine disrupting chemicals: human exposure and health risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2006. 24(2): p. 183-224.
22. Naciff, J.M., M.L. Jump, S.M. Torontali, G.J. Carr, J.P. Tiesman, et al., Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicol Sci*, 2002. 68(1): p. 184-99.
23. Miyamoto, T., T. Shiozawa, H. Kashima, Y.Z. Feng, A. Suzuki, et al., Estrogen up-regulates mismatch repair activity in normal and malignant endometrial glandular cells. *Endocrinology*, 2006. 147(10): p. 4863-70.
24. Daftary, G.S. and H.S. Taylor, Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev*, 2006. 27(4): p. 331-55.
25. Iso, T., T. Watanabe, T. Iwamoto, A. Shimamoto, and Y. Furuichi, DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol Pharm Bull*, 2006. 29(2): p. 206-10.
26. Iso, T., K. Futami, T. Iwamoto, and Y. Furuichi, Modulation of the expression of bloom helicase by estrogenic agents. *Biol Pharm Bull*, 2007. 30(2): p. 266-71.
27. Lemmen, J.G., R.J. Arends, P.T. van der Saag, and B. van der Burg, In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 2004. 112(15): p. 1544-9.
28. Yamada, H., I. Furuta, E.H. Kato, S. Kataoka, Y. Usuki, et al., Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol*, 2002. 16(6): p. 735-9.
29. Schonfelder, G., K. Friedrich, M. Paul, and I. Chahoud, Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia*, 2004. 6(5): p. 584-94.
30. Schonfelder, G., W. Wittfoht, H. Hopp, C.E. Talsness, M. Paul, et al., Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*, 2002. 110(11): p. A703-7.
31. Engel, S.M., B. Levy, Z. Liu, D. Kaplan, and M.S. Wolff, Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol*, 2006. 21(1): p. 110-2.
32. Zalko, D., A.M. Soto, L. Dolo, C. Dorio, E. Rathahao, et al., Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect*, 2003. 111(3): p. 309-19.
33. Mariscal-Arcas, M., A. Rivas, A. Granada, C. Monteagudo, M.A. Murcia, et al., Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem Toxicol*, 2009. 47(2): p. 506-10.
34. Kuruto-Niwa, R., Y. Tateoka, Y. Usuki, and R. Nozawa, Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*, 2007. 66(6): p. 1160-4.
35. Baker, T.G., A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1963. 158: p. 417-33.
36. Hoffmann, E.R. and R.H. Borts, Meiotic recombination intermediates and mismatch repair proteins. *Cytogenet Genome Res*, 2004. 107(3-4): p. 232-48.
37. Hunt, P.A., K.E. Koehler, M. Susiarjo, C.A. Hodges, A. Ilagan, et al., Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol*, 2003. 13(7): p. 546-53.
38. Can, A., O. Semiz, and O. Cinar, Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod*, 2005. 11(6): p. 389-96.
39. Eichenlaub-Ritter, U., E. Vogt, S. Cukurcam, F. Sun, F. Pacchierotti, et al., Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutat Res*, 2008. 651(1-2): p. 82-92.
40. Lenie, S., R. Cortvrindt, U. Eichenlaub-Ritter, and J. Smitz, Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutat Res*, 2008. 651(1-2): p. 71-81.

41. Mlynarcikova, A., E. Nagyova, M. Fickova, and S. Scsukova, Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol In Vitro*, 2009. 23(3): p. 371-7.
42. Mohri, T. and S. Yoshida, Estrogen and bisphenol A disrupt spontaneous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 326(1): p. 166-73.
43. Susiarjo, M., T.J. Hassold, E. Freeman, and P.A. Hunt, Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet*, 2007. 3(1): p. e5.
44. Hunt, P.A., M. Susiarjo, C. Rubio, and T.J. Hassold, The bisphenol A experience: a primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction. *Biol Reprod*, 2009. 81(5): p. 807-13.
45. Allard, P. and M.P. Colaiacovo, Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. 107(47): p. 20405-10.
46. Brieno-Enriquez, M.A., P. Robles, R. Garcia-Cruz, I. Roig, L. Cabero, et al., A new culture technique that allows in vitro meiotic prophase development of fetal human oocytes. *Hum Reprod*. 25(1): p. 74-84.
47. Raychoudhury, S.S., C.A. Blake, and C.F. Millette, Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999. 157(3): p. 192-202.
48. Richter, C.A., L.S. Birnbaum, F. Farabollini, R.R. Newbold, B.S. Rubin, et al., In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*, 2007. 24(2): p. 199-224.
49. Xu, J., Y. Osuga, T. Yano, Y. Morita, X. Tang, et al., Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 292(2): p. 456-62.
50. Mlynarcikova, A., M. Fickova, and S. Scsukova, Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocr Regul*, 2005. 39(1): p. 21-32.
51. Bontempo, P., L. Mita, A. Doto, M. Miceli, A. Nebbioso, et al., Molecular analysis of the apoptotic effects of BPA in acute myeloid leukemia cells. *J Transl Med*, 2009. 7: p. 48.
52. Lund, S.A., J. Murdoch, E.A. Van Kirk, and W.J. Murdoch, Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. *Biol Reprod*, 1999. 61(2): p. 388-92.
53. Miller, A.P., D. Xing, W. Feng, M. Fintel, Y.F. Chen, et al., Aged rats lose vasoprotective and anti-inflammatory actions of estrogen in injured arteries. *Menopause*, 2007. 14(2): p. 251-60.
54. Symonds, D.A., I. Merchenthaler, and J.A. Flaws, Methoxychlor and estradiol induce oxidative stress DNA damage in the mouse ovarian surface epithelium. *Toxicol Sci*, 2008. 105(1): p. 182-7.
55. Hiroi, H., O. Tsutsumi, M. Momoeda, Y. Takai, Y. Osuga, et al., Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr J*, 1999. 46(6): p. 773-8.
56. Takayanagi, S., T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, et al., Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett*, 2006. 167(2): p. 95-105.
57. Pesce, M., M.G. Farrace, M. Piacentini, S. Dolci, and M. De Felici, Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development*, 1993. 118(4): p. 1089-94.
58. Zeuner, A., M. Signore, D. Martinetti, M. Bartucci, C. Peschle, et al., Chemotherapy-induced thrombocytopenia derives from the selective death of megakaryocyte progenitors and can be rescued by stem cell factor. *Cancer Res*, 2007. 67(10): p. 4767-73.
59. Thomas, F.H. and B.C. Vanderhyden, Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006. 4: p. 19.
60. Moniruzzaman, M. and T. Miyano, KIT-KIT ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles. *J Reprod Dev*, 2007. 53(6): p. 1273-81.
61. Moniruzzaman, M., K. Sakamaki, Y. Akazawa, and T. Miyano, Oocyte growth and follicular development in KIT-deficient Fas-knockout mice. *Reproduction*, 2007. 133(1): p. 117-25.



62. Abir, R., B. Fisch, S. Jin, M. Barnnet, G. Kessler-Icekson, et al., Expression of stem cell factor and its receptor in human fetal and adult ovaries. *Fertil Steril*, 2004. 82 Suppl 3: p. 1235-43.
63. Petronczki, M., M.F. Siomos, and K. Nasmyth, Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, 2003. 112(4): p. 423-40.
64. Bannister, L.A. and J.C. Schimenti, Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenet Genome Res*, 2004. 107(3-4): p. 191-200.
65. Susiarjo, M. and P. Hunt, Bisphenol A exposure disrupts egg development in the mouse. *Fertil Steril*, 2008. 89(2 Suppl): p. e97.
66. Vaskivuo, T.E., M. Maentausta, S. Torn, O. Oduwole, A. Lonnberg, et al., Estrogen receptors and estrogen-metabolizing enzymes in human ovaries during fetal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(6): p. 3752-6.
67. Greschik, H., J.M. Wurtz, S. Sanglier, W. Bourguet, A. van Dorsselaer, et al., Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell*, 2002. 9(2): p. 303-13.
68. Roig, I., I. Vanrell, A. Ortega, L. Cabero, J. Egozcue, et al., The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. *Stromal ovarian culture cytogenetic diagnosis. Cytotechnology*, 2003. 41(1): p. 45-9.
69. Garcia, M., A.J. Dietrich, L. Freixa, A.C. Vink, M. Ponsa, et al., Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy. *Hum Genet*, 1987. 77(3): p. 223-32.
70. Roig, I., R. Garcia, P. Robles, R. Cortvrindt, J. Egozcue, et al., Human fetal ovarian culture permits meiotic progression and chromosome pairing process. *Hum Reprod*, 2006. 21(6): p. 1359-67.
71. Ghafari, F., C.G. Gutierrez, and G.M. Hartshorne, Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Dev Biol*, 2007. 7: p. 87.
72. Eijpe, M., H. Offenbergh, R. Jessberger, E. Revenkova, and C. Heyting, Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol*, 2003. 160(5): p. 657-70.
73. Yang, F. and P.J. Wang, The Mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond. *Genome Dyn*, 2009. 5: p. 69-80.
74. Kolas, N.K. and P.E. Cohen, Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination. *Cytogenet Genome Res*, 2004. 107(3-4): p. 216-31.
75. Robles, P., I. Roig, R. Garcia, M. Brieno, M. Martin, et al., Analysis of recombination along chromosome 21 during human female pachytene stage. *Reprod Biomed Online*, 2009. 18(6): p. 784-94.

## Figures legends /captions

**Figure 1.** Diagram of the experimental design.

Experimental protocol followed to culture each sample (for more details see at Supporting Material and Methods). Control: oocytes cultured with non-supplemented medium. DMSO: oocytes cultured with DMSO-supplemented medium as negative control. BPA 1 $\mu$ M: oocytes cultured with 1 $\mu$ M BPA-supplemented medium. BPA 5 $\mu$ M: oocytes cultured with 5 $\mu$ M BPA-supplemented medium. BPA 10 $\mu$ M: oocytes cultured with 10 $\mu$ M BPA-supplemented medium. BPA 20 $\mu$ M: oocytes cultured with 20 $\mu$ M BPA-supplemented medium. BPA 30 $\mu$ M: oocytes cultured with 30 $\mu$ M BPA-supplemented medium. E<sub>2</sub> 1nM: oocytes cultured with 1nM E<sub>2</sub>-supplemented medium. E<sub>2</sub> 5nM: oocytes cultured with 5nM E<sub>2</sub>-supplemented medium. E<sub>2</sub> 10nM: oocytes cultured with 10nM E<sub>2</sub>-supplemented medium. E<sub>2</sub> 20nM: oocytes cultured with 20nM E<sub>2</sub>-supplemented medium. E<sub>2</sub> 30nM: oocytes cultured with 30nM E<sub>2</sub>-supplemented medium, all of them as a positive control. T7: 7 days after culture. T14: 14 days after culture. T21: 21 days after culture.

**Figure 2.** Variations in the percentage of oocytes at different stages of cultures treated with BPA and E<sub>2</sub>, compared to control.

A, Degenerated oocytes; B, oocytes at leptoneuma; C, oocytes at pachynema.

**Figure 3.** MLH1 mean *foci* number at pachynema and total number of MLH1 *foci* found on chromosome 21.

A, MLH1 mean *foci* number at pachynema from oocytes cultured; B, MLH1 *foci* found on chromosome 21.

**Figure 4.** MLH1 *foci* in different culture days detected by IF.

MLH1 *foci* in different culture days detected by IF, stained with antibodies against SYCP1 (red) and MLH1 (green). A, Oocyte at T7 cultured with control medium; B, Oocyte at T7 cultured with 30 $\mu$ M BPA-supplemented medium; C, Oocyte at T7 cultured with 30nM E<sub>2</sub>-supplemented medium; D,

Oocyte at T14 cultured with control medium; E, Oocyte at T14 cultured with 30 $\mu$ M BPA-supplemented medium; F, Oocyte at T14 cultured with 30nM E<sub>2</sub>-supplemented medium; G, Oocyte at T21 cultured with control medium; H, Oocyte at T21 cultured with 30 $\mu$ M BPA-supplemented medium; I, Oocyte at T21 cultured with 30nM E<sub>2</sub>-supplemented medium; J, MLH1 *foci* in oocyte at T7 treated with 30 $\mu$ M BPA-supplemented medium, the arrows indicate the places of MLH1 *foci* on chromosome 21; K, Oocyte hybridized with chromosome 21-specific probe (red).

**Table 1.** MLH1 mean *foci* number per cell at pachytene stage from different times of culture and culture media used.

Treatment group	Culture times								
	Mean <i>foci</i>	T7 SD	Range	Mean <i>foci</i>	T14 SD	Range	Mean <i>foci</i>	T21 SD	Range
Control	47.21	7.45	26-69	49.61	7.06	29-61	50.05	7.19	29-56
DMSO	52.06	8.94	37-60	51.89	8.18	32-64	50.90	8.19	27-59
BPA 1 $\mu$ M	47.02	8.12	32-63	48.52	5.83	24-65	47.82	6.75	35-66
BPA 5 $\mu$ M	51.32	6.99	29-64	50.78	7.42	27-62	51.03	5.17	35-63
BPA 10 $\mu$ M	87.48*	9.52	31-98	88.84*	10.01	44-109	90.39*	12.04	40-102
BPA 20 $\mu$ M	102.03*	15.34	25-125	102.91*	13.50	70-132	103.00*	18.01	55-146
BPA 30 $\mu$ M	109.72*	17.39	19-150	110.03*	17.63	80-158	112.04*	13.04	74-164
E <sub>2</sub> 1 nM	48.89	7.06	31-65	49.61	7.04	35-56	48.92	7.29	32-60
E <sub>2</sub> 5 nM	51.82	4.89	27-65	50.04	6.90	31-68	50.89	5.00	31-59
E <sub>2</sub> 10 nM	47.64	4.72	29-64	59.66	8.12	32-94	64.28*	5.17	25-100
E <sub>2</sub> 20 nM	51.24	5.83	32-63	75.47*	6.14	34-79	74.85*	9.75	31-98
E <sub>2</sub> 30 nM	49.55	5.06	30-59	88.04*	9.23	21-101	85.29*	12.84	28-103

\*Statistical differences Two-way ANOVA, Bonferroni post-test,  $p \leq 0.05$  (differences control media vs supplemented media).

**Figure 1.**

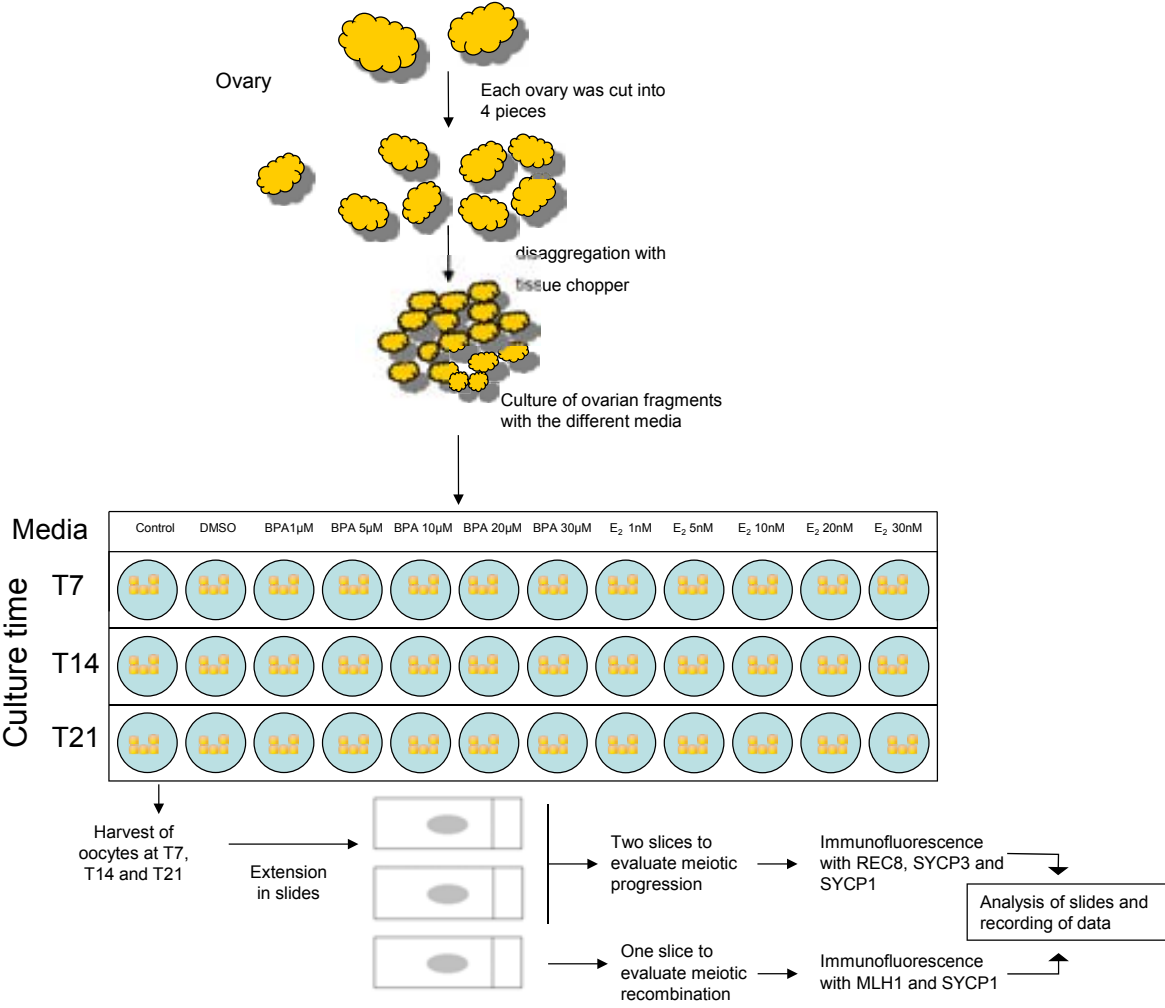


Figure 2.

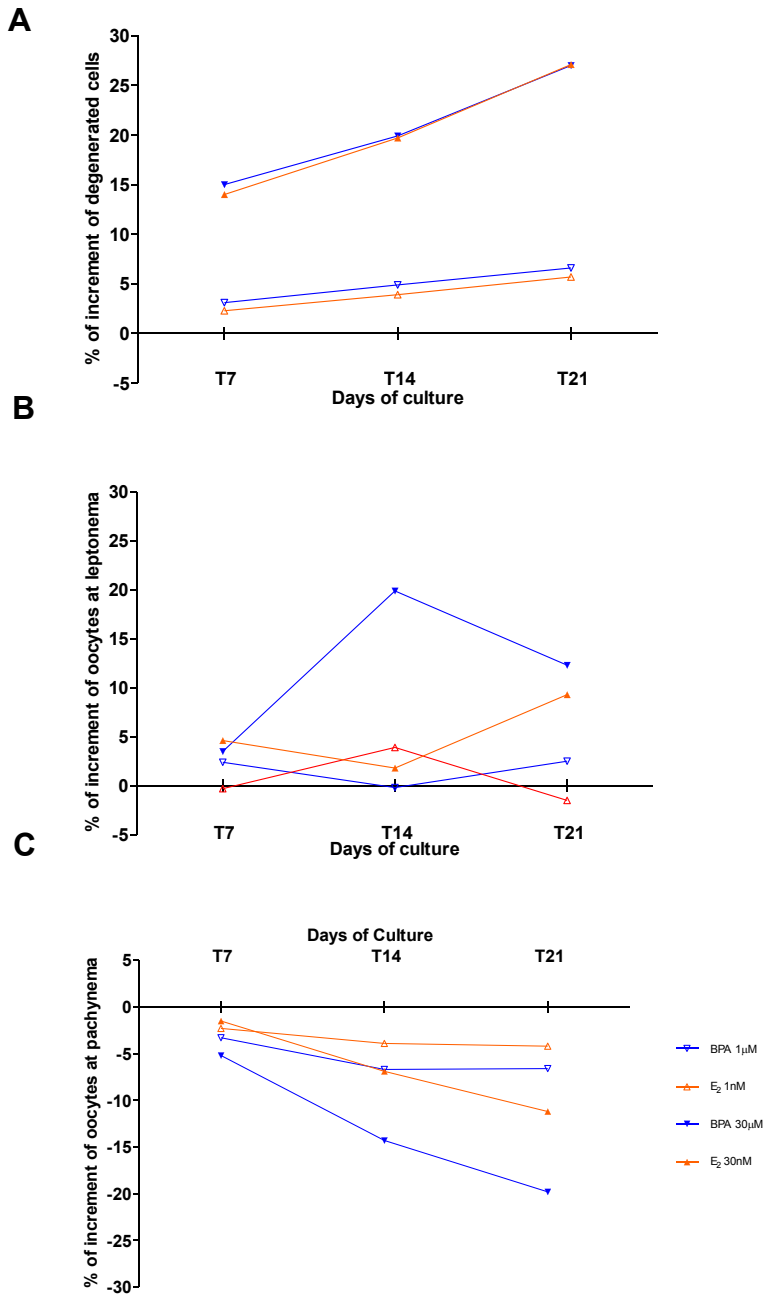


Figure 3.

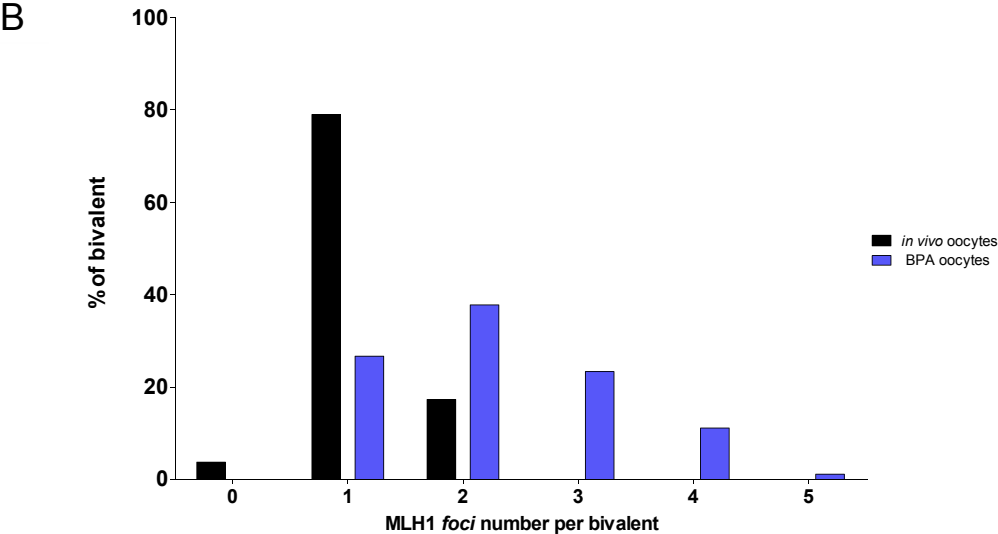
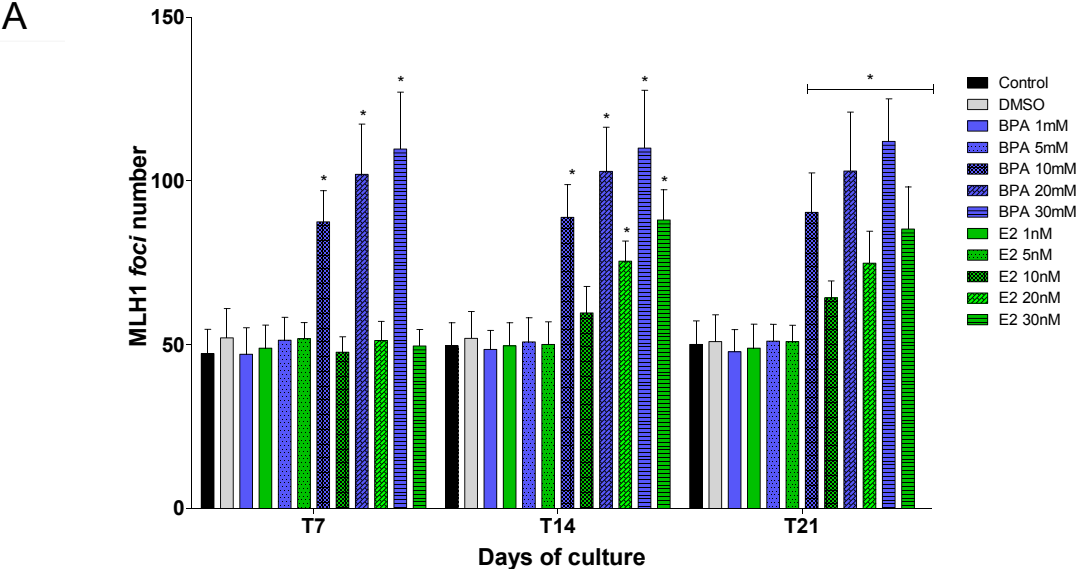
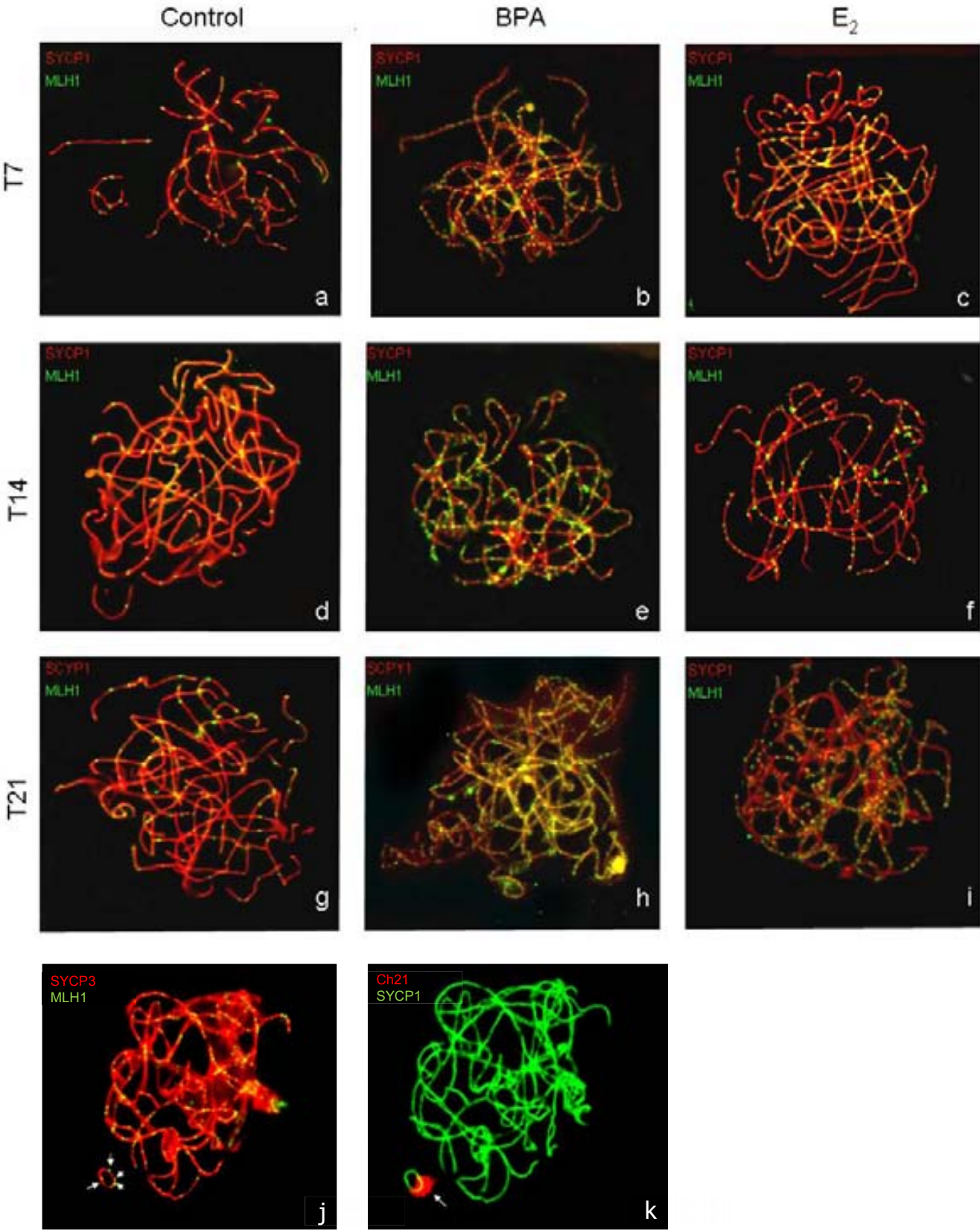


Figure 4.





## Supporting information

### List of supporting information

#### 1) Supporting Material and Methods:

Biological material, Culture conditions, Oocyte spread preparation, Immunofluorescence, Chromosome-21 FISH, Image analysis and statistics.

#### 2) Supporting Tables

**Table S1.** Oocytes analyzed per culture time and culture medium.

**Table S2.** Total number and percentage of degenerated oocytes found per culture time and culture medium.

**Table S3.** Percentage of oocytes at leptonema from different times of culture and culture medium.

**Table S4.** Percentage of oocytes at zygonema from different times of culture and culture medium.

**Table S5.** Percentage of oocytes at pachynema stage from different times of culture and culture medium.

**Table S6.** Total number of oocytes at pachynema analyzed for recombination.

**Table S7.** MLH1 mean *foci* number distribution per bivalent.

**Table S8.** Biological material used.

#### 3) Supporting References

## 1) Supporting Material and Methods

### Biological material

Twelve ovaries were obtained from the Vall d'Hebron Fetal Tissue Bank, following the rules of the Ethical Committee of the Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. Last menstrual period, ultrasound analysis and foot length were used to calculate gestational age. All of the fetuses were euploid, the karyotype was obtained by prenatal diagnosis and confirmed in the laboratory with the karyotype of cultured fetal ovary *stroma* fibroblasts [1]. Inclusion criteria were: euploid fetuses, gestational age between 18 and 22 weeks, less than 2 hours from the end of the obstetric procedure and the start of the culture process. Cases used are shown in Table S8.

### Culture conditions

Ovaries were collected in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco BRL) supplemented with 100IU/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin (both from Gibco BRL) and transported to the laboratory at 4°C. To ensure equal inclusion of cortical and medullar ovarian regions, each ovary was cut transversely, obtaining 4 equal-sized pieces of approximately 3mm x 5mm x 5mm (width x depth x height). Ovaries were cultured following the fetal human oocytes culture technique described elsewhere [2] (Experimental design shown in Figure 1). Briefly, the four ovary pieces were cut with a Mclwain Tissue Chopper (Jed Pella Inc; Redding, CA, USA) into mini-blocks of approximately 1mm x 1mm x 1mm. After that, the mini-blocks were re-suspended in culture medium. Five mini-blocks per well were seeded in a 24-wells cell-culture cluster (Costar, Corning Inc; NY, USA).

Control medium used was: D-MEM (Gibco BLR) supplemented with 5µg/ml insulin, 5µg/ml transferrin, 5ng/ml selenium, 100ng/ml stem cell factor (SCF) (all from Sigma; Munich, Germany), 100UI/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin (both from Gibco BLR). The mini-blocks were seeded and cultured for seven (T7), fourteen (T14) or twenty-one days (T21) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Bisphenol A, and estradiol (E<sub>2</sub>), were dissolved in 0.01% dimethyl sulphoxide (DMSO) (all from Sigma; Munich, Germany). A live/dead cell double-staining kit (Sigma; Munich, Germany) was used to obtain the optimal concentration of DMSO (data not shown).

Twelve different culture conditions were studied. Control group: Oocytes cultured with control medium. DMSO-supplemented medium: To test the influence of DMSO on oocytes, oocytes were cultured with control medium + 0.01% DMSO. BPA-supplemented medium: Five different concentrations of BPA were added to control medium: 1µM, 5µM, 10µM, 20µM and 30 µM BPA. The concentration range was chosen according to EPA and UE legislation as well as concentrations used in previous reports. E<sub>2</sub>-supplemented medium: β-estradiol (E<sub>2</sub>) was selected as a positive control of steroid hormone action. Five BPA equipotent concentrations of E<sub>2</sub> were added

to control medium (1nM, 5nM, 10nM, 20nM and 30nM E<sub>2</sub>). Every two days, 50% of the culture medium was changed for fresh medium. Oocytes were removed from the wells as described elsewhere [2].

### **Oocyte spread preparation**

Oocyte spread preparations were performed as described elsewhere [2]. Briefly, the pellet was re-suspended in 1.5ml of PBS and then the suspension was cyto-centrifuged with 500µl of 0.02M sucrose solution for 15 min at 115g. After that, the slides were placed in a humid chamber at room temperature for two hours and then fixed with formaldehyde (9%, pH 10). After 24h at room temperature, slides were washed with 1% PhotoFlo (Kodak; Paris, France) four times and air-dried; slides were kept at -80°C until their study.

### **Immunofluorescence**

Immunofluorescence against proteins of SYCP3 and SYCP1 of the synaptonemal complex (Abcam plc; Cambridge, UK), cohesin REC8, and mismatch repair protein MLH1 (BD Pharmigen, Becton Dickinson France S.A.S.; Erembodegem, Belgium) was performed as described elsewhere [2]. Briefly, the oocytes were treated with 0.1% triton-X (Sigma; Munich, Germany) in PBS for 45 min after the fixation process. Primary antibodies were diluted in blocking solution and incubated 24h at 4°C in a humid chamber. Unattached antibodies were removed with PBS and detection was performed with goat anti-rabbit FITC, goat anti-rabbit Cy3, goat anti-mouse Cy3, goat anti-mouse FICT (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA, USA). Secondary antibodies were incubated 1h at 37°C in a humid chamber. Unattached secondary antibodies were removed with PBS, and the signal was fixed with 1% formaldehyde. DNA was counterstained by applying antifade solution (Vector laboratories; Burlingame, CA, USA) containing 0.1 mg/µl of DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) (Sigma; Munich, Germany).

Oocytes were sub-staged according to morphological criteria described in previous studies (Figure S1) [1-4]. As was described previously at leptonema, chromosomes start condensation, and the lateral elements of synaptonemal complex (SYCP2 and SYCP3) are assembled over a cohesin scaffold (REC8). During zygonema, the SYCP1 protein creates a zipper-like structure between both pairs of sister chromatids to complete synapsis [5-7]. Finally, at pachynema bivalents are fully paired and all of the elements look like one single structure. As was previously reported by Roig et al. (2005), oocytes in culture could degenerate and this process is especially higher in oocytes at pachynema. The evaluation of these oocytes was performed by the contraction and deformation of nuclei in the presence of SYCP3 and SYCP1 protein [3].

### **Chromosome 21 FISH**

A chromosome 21-specific probe (REF: LPP/R) (Aquarius probes, Cytocell; Cambridge, UK) was used for the identification of chromosome 21. The probe was hybridized on previously immunostained preparations. Briefly, slides were washed with 2xSSC pH 7.0 for 2 minutes, after which they were dehydrated in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each one for 2min, and dried at room temperature. Immediately, thereafter, 10µl of probe were added to the sample and the slide was covered with a coverslip. Denaturalization of the sample and probe was performed simultaneously by heating a hotplate at 75°C for 2 minutes. Hybridization was performed in a humid lightproof container at 37°C overnight. After hybridization, the slides were washed in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C for two minutes followed by a second wash with 2xSSC+0.05% Tween 20, at room temperature for 30 seconds. Finally, DNA was counterstained by applying antifade solution containing 0.1 mg/µl of DAPI (Sigma).

### **Image analysis and statistics**

All samples were analyzed using an Olympus BX70 fluorescence microscope (Olympus Optical Co; Hamburg, Germany). Images were captured and produced using Smart Capture software. To match the fluorescence intensity that was observed by microscope, images were processed using Adobe Photoshop. Statistical analysis among sample repeat and inter-sample repeat was performed using U Mann-Whitney. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test was applied to compare control oocytes to treated oocytes. The MLH1 mean *foci* number distribution in chromosome 21 was evaluated using the Kruskal-Wallis test. Statistical significance for variables in all tests was set at less than or equal to 0.05.

## 1) Supporting Tables

**Table S1.** Oocytes analyzed per culture time and culture medium.

Culture time	Treatment group											
	Control	DMSO	BPA 1 $\mu$ M	BPA 5 $\mu$ M	BPA 10 $\mu$ M	BPA 20 $\mu$ M	BPA 30 $\mu$ M	E <sub>2</sub> 1nM	E <sub>2</sub> 5 nM	E <sub>2</sub> 10 nM	E <sub>2</sub> 20 nM	E <sub>2</sub> 30 nM
T7	766	742	664	621	576	575	509	672	643	588	536	503
T14	533	512	470	438	463	450	424	481	450	434	419	403
T21	397	381	351	327	354	356	350	369	349	334	327	338

**Table S2.** Total number and percentage of degenerated oocytes found per culture time and culture medium

Treatment group	Culture times								
		T7			T14			T21	
	%	SD	N	%	SD	N	%	SD	N
Control	3.5	1.63	27	9.4	1.87	50	17.9	1.72	71
DMSO	4.5	1.37	33	10.2	2.06	52	20.5*	1.89	78
BPA 1 µM	6.6*	1.86	44	14.3*	1.60	67	24.5*	1.03	86
BPA 5 µM	9.2*	2.07	57	18.0*	1.60	79	28.8*	1.03	94
BPA 10 µM	12.9*	1.50	74	21.4*	1.04	99	33.6*	1.72	119
BPA 20 µM	15.3*	1.03	88	24.9*	1.63	112	38.5*	2.48	137
BPA 30 µM	18.5*	1.50	94	29.3*	2.73	124	44.9*	2.04	157
E <sub>2</sub> 1 nM	5.8*	1.64	39	13.3*	2.06	64	23.6*	0.54	87
E <sub>2</sub> 5 nM	8.7*	1.21	56	18.2*	2.87	82	28.7*	2.73	100
E <sub>2</sub> 10 nM	11.9*	1.03	70	21.4*	1.51	93	35.0*	3.50	117
E <sub>2</sub> 20 nM	14.7*	1.16	79	25.5*	1.60	107	39.8*	3.52	130
E <sub>2</sub> 30 nM	17.5*	0.81	88	29.0*	3.03	117	45.0*	3.66	152

\*Statistical differences, Two-way ANOVA with Bonferroni post-test (p=0.05), (differences of control medium vs supplemented medium).

**Table S3.** Percentage of oocytes at leptonema from different times of culture and culture medium.

Treatment group	Culture times								
	T7			T14			T21		
	%	SD	N	%	SD	N	%	SD	N
Control	44.7	4.05	330	37.7	5.11	163	29.4	2.23	96
DMSO	45.0	3.81	319	35.0	3.20	161	31.4	3.04	95
BPA 1 $\mu$ M	47.1	3.03	292	37.5	5.64	151	35.0*	1.77	93
BPA 5 $\mu$ M	46.3	4.25	261	40.1	2.74	144	42.1*	1.91	98
BPA 10 $\mu$ M	46.8	3.72	235	43.7*	2.58	159	43.0*	4.59	101
BPA 20 $\mu$ M	47.2	4.69	230	46.2*	4.09	156	51.1*	5.04	112
BPA 30 $\mu$ M	48.2	3.35	200	50.0*	3.30	150	51.8*	3.49	100
E <sub>2</sub> 1 nM	44.4	3.49	281	36.2	5.21	151	34.0*	3.79	96
E <sub>2</sub> 5 nM	47.2	3.66	277	38.6	6.03	142	36.1*	5.12	90
E <sub>2</sub> 10 nM	42.9	2.06	222	39.6	3.74	135	36.4*	3.46	79
E <sub>2</sub> 20 nM	42.2	3.54	193	40.7	3.48	127	42.1*	3.02	83
E <sub>2</sub> 30 nM	41.9	1.98	174	39.5	1.62	113	38.7*	3.17	72

\*Statistical differences for Two-way ANOVA, Bonferroni post-test  $p < 0.05$  (differences of control medium vs supplemented medium).

**Table S4.** Percentage of oocytes at zygonema from different times of culture and culture medium.

Treatment group	Culture times								
	T7			T14			T21		
	%	SD	N	%	SD	N	%	SD	N
Control	32.3	2.17	239	36.2	2.59	175	38.3	2.51	125
DMSO	32.3	2.59	229	35.0	3.01	161	37.3	3.13	113
BPA 1 $\mu$ M	33.1	2.84	205	39.2	4.59	158	39.3	2.56	104
BPA 5 $\mu$ M	34.9	2.08	197	38.7	2.74	139	37.3	1.38	87
BPA 10 $\mu$ M	34.6	2.61	174	39.3	2.28	143	37.5	2.06	88
BPA 20 $\mu$ M	34.7	2.16	169	36.4	1.96	123	34.7	1.98	76
BPA 30 $\mu$ M	34.0	3.50	141	34.3	2.54	103	39.4	3.27	69
E <sub>2</sub> 1 nM	34.9	1.90	221	37.7	2.68	157	37.9	3.11	107
E <sub>2</sub> 5 nM	35.6	1.80	197	36.4	3.02	134	39.8	2.45	99
E <sub>2</sub> 10 nM	34.8	2.95	180	34.0	4.69	116	39.2	4.45	85
E <sub>2</sub> 20 nM	36.5	4.31	167	35.7	3.92	111	37.0	4.06	73
E <sub>2</sub> 30 nM	36.6*	3.37	152	37.4	4.54	107	40.3	4.04	75

\*Statistical differences for Two-way ANOVA with Bonferroni post-test,  $p \leq 0.05$ , (differences of control medium vs supplemented medium).



**Table S5.** Percentage of oocytes at pachynema from different times of culture and culture medium.

Treatment group	Culture times								
	T7			T14			T21		
	%	SD	N	%	SD	N	%	SD	N
Control	23.0	3.54	170	30.0	3.64	145	32.2	2.52	105
DMSO	22.7	2.96	161	30.0	2.62	138	31.4	3.95	95
BPA 1 $\mu$ M	19.8	3.09	123	23.3*	2.01	94	25.7*	2.30	68
BPA 5 $\mu$ M	18.8*	3.41	106	29.3	2.09	76	20.6*	2.12	48
BPA 10 $\mu$ M	18.5*	2.66	93	17.0*	3.06	62	19.6*	3.19	46
BPA 20 $\mu$ M	18.1*	1.55	88	17.5*	1.11	59	14.2*	1.54	31
BPA 30 $\mu$ M	17.8*	1.85	74	15.7*	2.00	47	12.4*	2.08	24
E <sub>2</sub> 1 nM	20.7	1.93	131	26.1*	1.54	109	28.0*	2.91	79
E <sub>2</sub> 5 nM	19.3*	1.86	113	25.0*	1.61	92	24.1*	1.63	60
E <sub>2</sub> 10 nM	22.4	1.54	116	26.4*	2.07	90	24.4*	2.76	53
E <sub>2</sub> 20 nM	21.2	1.17	97	23.7*	2.84	74	20.8*	1.85	41
E <sub>2</sub> 30 nM	21.5	1.14	89	23.1*	3.63	66	21.0*	2.05	39

**Table S6.** Total number of oocytes at pachynema analyzed for recombination.

Culture time	Treatment group											
	Control	DMSO	BPA 1 $\mu$ M	BPA 5 $\mu$ M	BPA 10 $\mu$ M	BPA 20 $\mu$ M	BPA 30 $\mu$ M	E <sub>2</sub> 1nM	E <sub>2</sub> 5 nM	E <sub>2</sub> 10 nM	E <sub>2</sub> 20 nM	E <sub>2</sub> 30 nM
<b>T7</b>	208	175	163	137*	126*	104*	90*	176	173	148*	131*	124*
<b>T14</b>	185	157	133	129*	103*	87*	71*	171	151*	116*	110*	83*
<b>T21</b>	149	129*	124	88*	81*	59*	48*	136	124	95*	81*	40*

\*Statistical differences for Two-way ANOVA, Bonferroni post-test,  $p \leq 0.05$ , (differences of control medium vs supplemented medium).

**Table S7.** MLH1 mean *foci* number distribution per bivalent 21.

	<b>MLH1 <i>foci</i> number per bivalent 21</b>					
	<b>0 (%)</b>	<b>1 (%)</b>	<b>2 (%)</b>	<b>3 (%)</b>	<b>4 (%)</b>	<b>5 (%)</b>
<b>Fresh oocytes</b>	3 (3.7)	64 (79.0)	14 (17.3)	-	-	-
<b>Cultured oocytes</b>	1 (1.2)	70 (83.3)	13 (15.5)	-	-	-
<b>Oocytes cultured with BPA</b>	-	26.7 (24)	34 (37.8)	21 (23.3)	10 (11.1)	1 (1.1)

Differences of MLH1 *foci* distribution between fresh oocyte and oocytes cultured with 20  $\mu$ M and 30 $\mu$ M BPA (T7).

**Table S8.** Biological material used

Case	GW (w)	FL (cm)	Diagnosis	Karyotype
V151	18	3.3	Acrania	46,XX
V153	21	3.7	Cardiopathy	46,XX
V154	20	3.1	Cardiopathy/Neural tube defect	46,XX
V155	21	3.6	Anencephaly	46,XX
V156	21	4.1	Neural tube defect	46,XX
V158	21	3.5	Social reason	46,XX

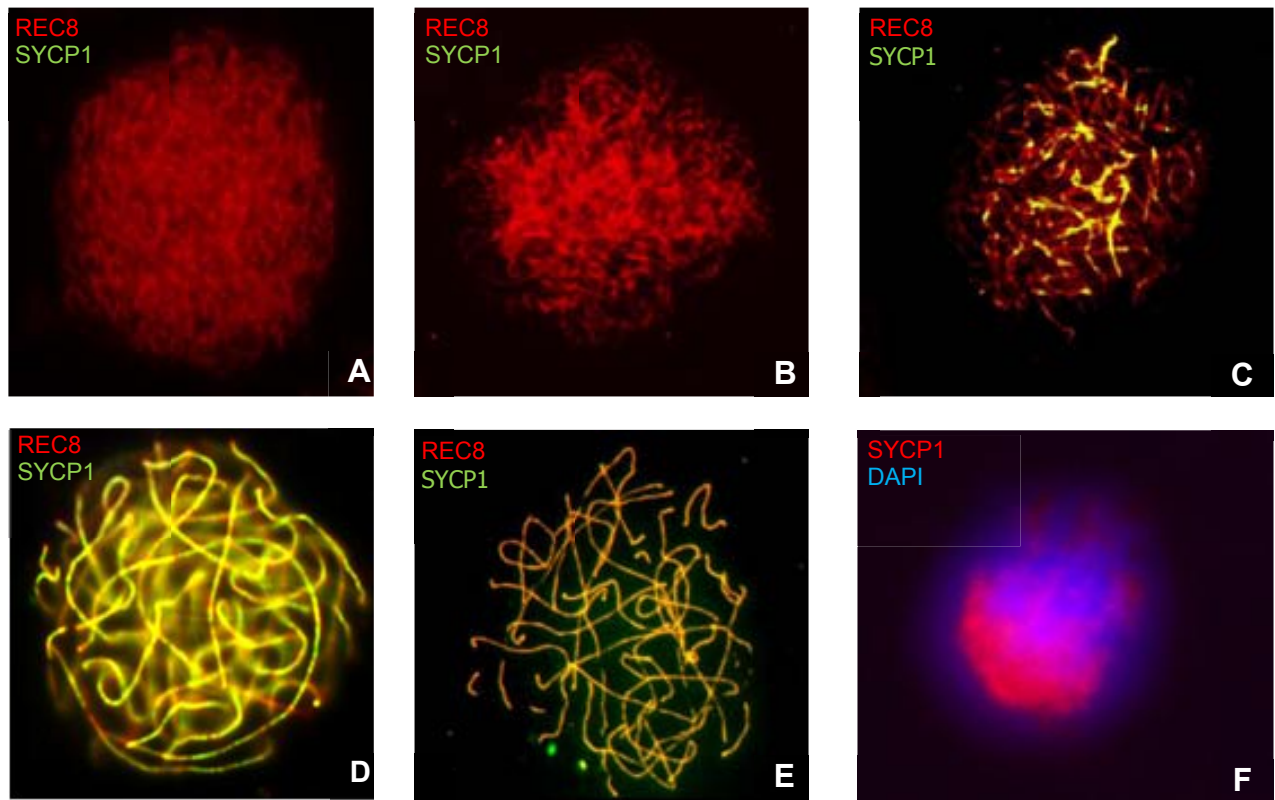
GW: gestational weeks.  
 FL: foot length in centimeters.

## 2) Supporting References

1. Roig, I., I. Vanrell, A. Ortega, L. Cabero, J. Egozcue, et al., The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. Stromal ovarian culture cytogenetic diagnosis. *Cytotechnology*, 2003. 41(1): p. 45-9.
2. Brieno-Enriquez, M.A., P. Robles, R. Garcia-Cruz, I. Roig, L. Cabero, et al., A new culture technique that allows in vitro meiotic prophase development of fetal human oocytes. *Hum Reprod*. 25(1): p. 74-84.
3. Roig, I., R. Garcia, P. Robles, R. Cortvrintd, J. Egozcue, et al., Human fetal ovarian culture permits meiotic progression and chromosome pairing process. *Hum Reprod*, 2006. 21(6): p. 1359-67.
4. Garcia, M., A.J. Dietrich, L. Freixa, A.C. Vink, M. Ponsa, et al., Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy. *Hum Genet*, 1987. 77(3): p. 223-32.
5. Ghafari, F., C.G. Gutierrez, and G.M. Hartshorne, Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Dev Biol*, 2007. 7: p. 87.
6. Eijpe, M., H. Offenber, R. Jessberger, E. Revenkova, and C. Heyting, Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol*, 2003. 160(5): p. 657-70.
7. Yang, F. and P.J. Wang, The Mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond. *Genome Dyn*, 2009. 5: p. 69-80.

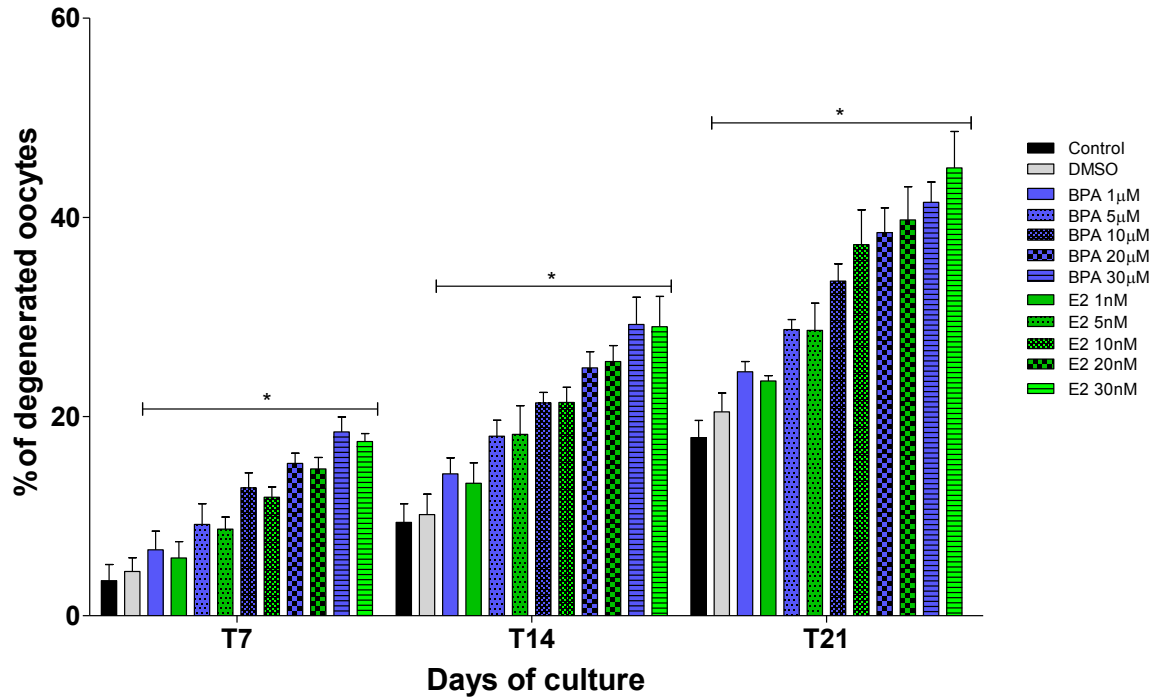
## Supporting Figures

**Figure S1.** Human meiotic prophase in oocytes of cultured ovaries.



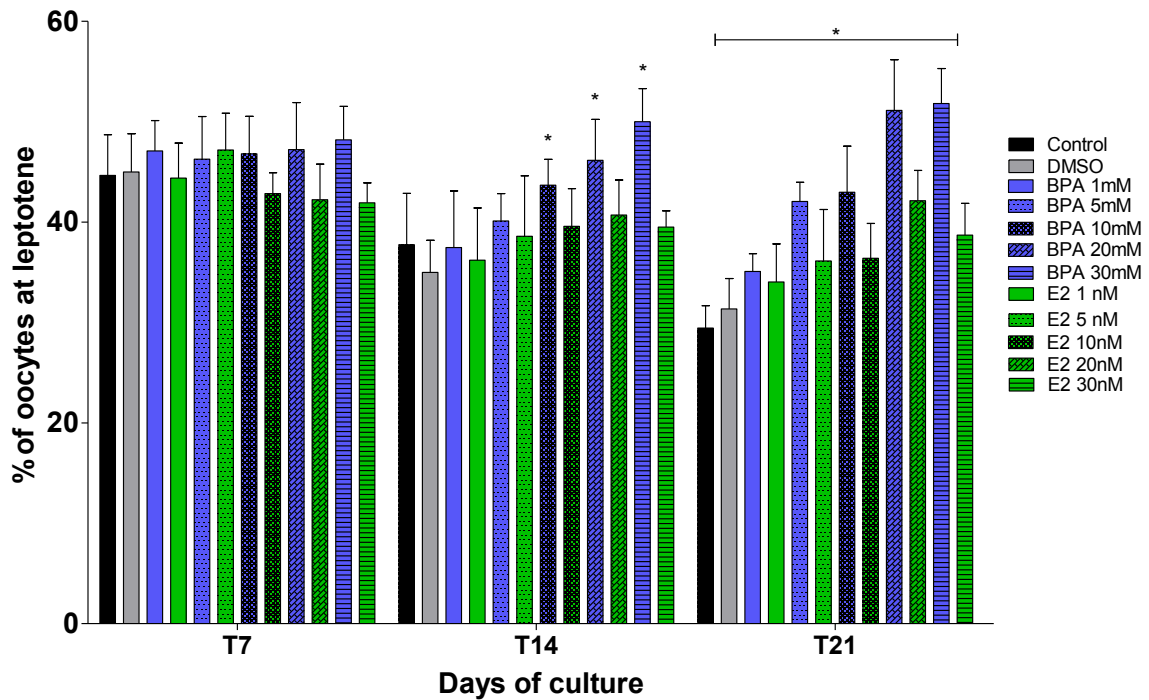
The first stages of meiotic prophase *in vitro* detected by immunofluorescence (IF) stained with antibodies versus REC8, SYCP3 and SYCP1: A, pre-leptonema; B, leptonema; C, early-zygonema; D, late-zygonema; E pachynema and F degenerated oocyte.

**Figure S2.** Percentage of degenerated oocytes of cultures treated with bisphenol A and estradiol.



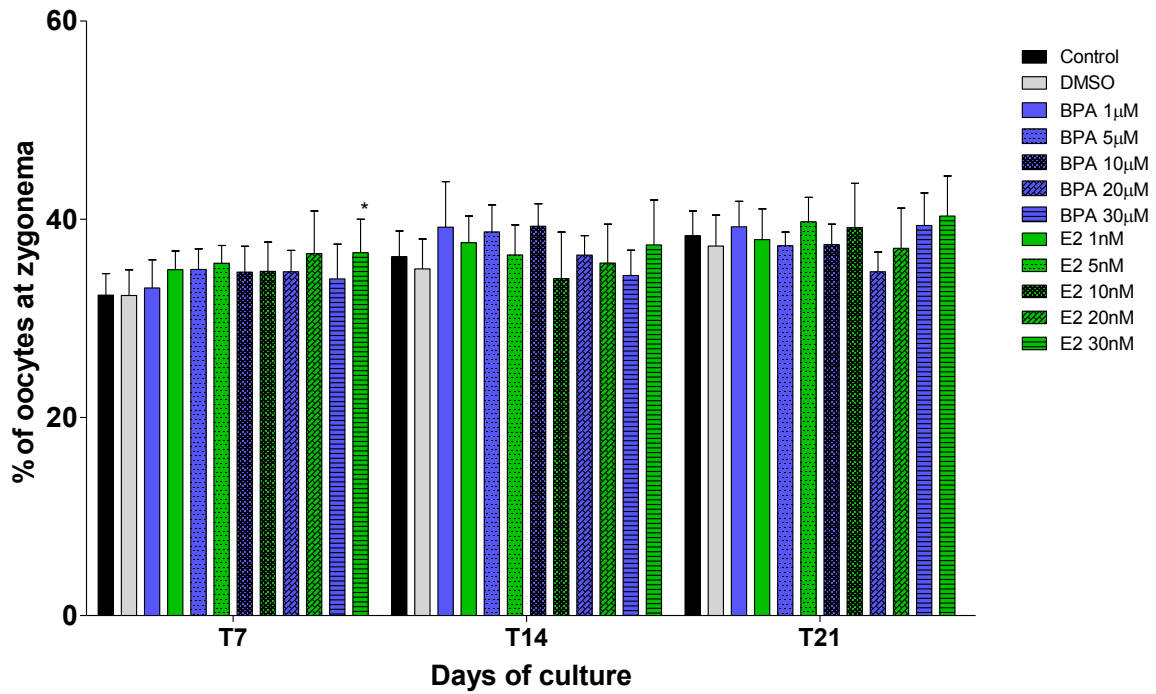
\*Statistical differences for Two-way ANOVA, Bonferroni post-test  $p < 0.05$  (differences of control medium vs supplemented medium).

**Figure S3.** Percentage of oocytes at leptotene of cultures treated with bisphenol A and estradiol.



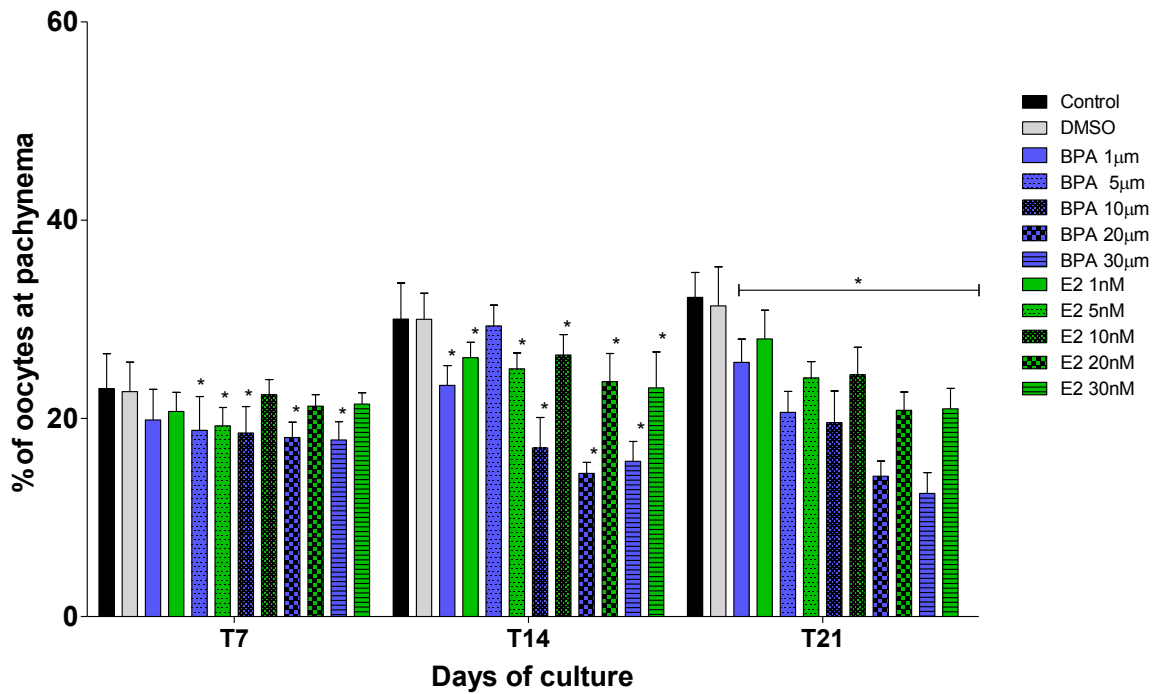
\*Statistical differences for Two-way ANOVA, Bonferroni post-test  $p < 0.05$  (differences of control medium vs supplemented medium).

**Figure S4.** Percentage of oocytes at zygonema of cultures treated with bisphenol A and estradiol.



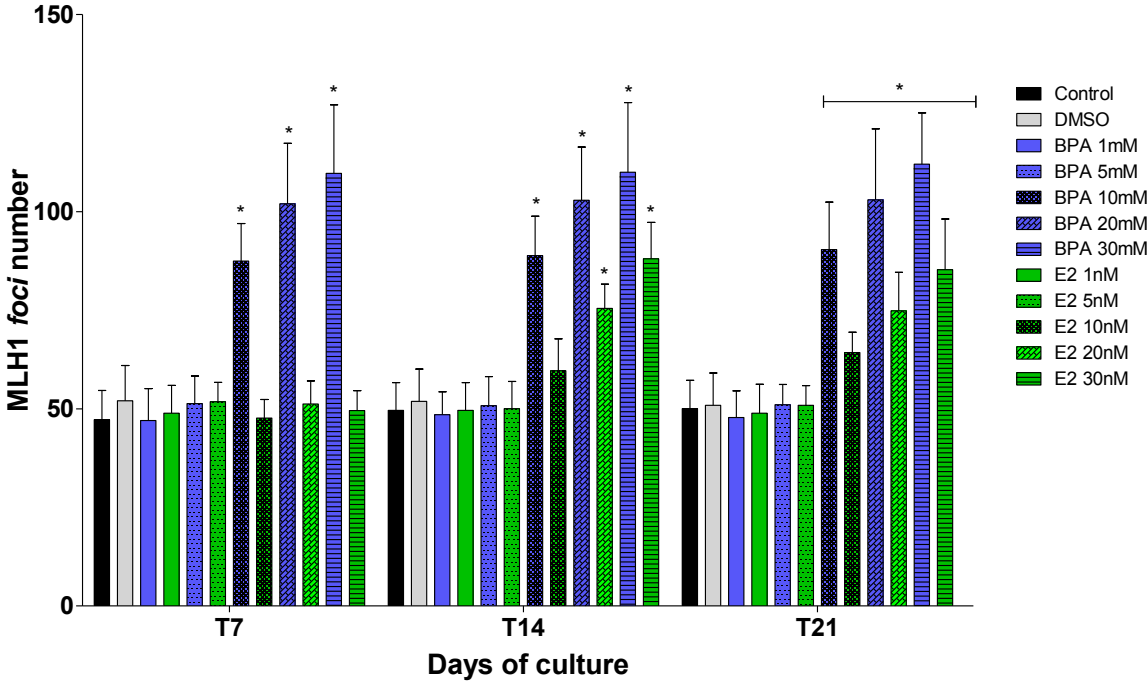
\*Statistical differences for Two-way ANOVA, Bonferroni post-test  $p < 0.05$  (differences of control medium vs supplemented medium).

**Figure S5.** Percentage of oocytes at pachynema of cultures treated with bisphenol A and estradiol.



\*Statistical differences for Two-way ANOVA, Bonferroni post-test  $p < 0.05$  (differences of control medium vs supplemented medium).

**Figure S6.** MLH1 mean *foci* number per cell at pachynema of different times of culture and culture medium used.



\*Statistical differences for Two-way ANOVA, Bonferroni post-test  $p < 0.05$  (differences of control medium vs supplemented medium).



### **4.3. RESULTADOS DEL TERCER OBJETIVO ESPECÍFICO**

Artículo 3

**"Gene expression is altered after BPA exposure in human fetal oocyte  
*in vitro*"**

Primer borrador



## Abstract

**Introduction:** Bisphenol A (BPA) is a “weak” endocrinal disruptor. The effect of BPA on human reproduction is controversial but has been related to meiotic anomalies, recurrent miscarriages and abnormal karyotypes. BPA crosses the placenta and recent studies have reported high levels in placental tissues and amniotic liquid. Previous reports in *C.elegans* and mice showed that BPA induces sterility, reducing the number of viable oocytes and embryo as well as impaired chromosome synapsis, disrupts double-strand breaks (DBS) repair progression, increases the levels of MLH1 *foci* number and impairs the chromosome segregation during metaphase. BPA-exposed human fetal oocytes have shown a diminution of oocyte survival, delay of meiotic progression and an elevated rate of MLH1 *foci in vitro*. The effects of BPA over gene expression had been studied in different tissues and cells; ovaries from mice exposed to BPA showed significant up-regulation of transcripts implied in meiotic pairing-synapsis genes.

**Objective:** The aim of this study was to characterize the gene expression of human fetal oocytes in culture as well as to evaluate the effect of BPA in cultured human oocytes. Evaluated genes were: *Smc1 $\beta$*  (involved in the sister chromatid cohesion), *Sycp1* (central element of synaptonemal complex), *Spo11*, *Rpa*, *H2ax*, *Mlh1* and *Blm* (involved in DBS generation, signaling and reparation), *Era*, *Er $\beta$*  and *Erry* (estrogen receptors), *Stra8* and *Nalp5* (both of them, markers of meiotic progression).

**Material and Methods:** To accomplish our objective, 12 ovaries from 6 euploid fetuses were used. The ovarian fetal tissue was cultivated in two groups: Control-group (D-MEM medium + SCF 90ng/ml and ITC) and BPA-group (D-MEM medium + SCF 90ng/ml + ITC + BPA30 $\mu$ M). The cultures were analyzed at T0 (un-cultured oocytes) and after 7, 14 and 21days of culture (T7, T14 and T21). Gene expression evaluation was performed by real-time PCR (RT-PCR).

**Results:** Gene expression was evaluated in oocytes cultured with control medium and no significant differences were observed among different times of culture for genes implied in pairing-synapsis and recombination. *Stra8* expression showed an increment at T7 and T14 corresponding to the progression of oogonias into oocytes. *Nalp5* expression showed an increment at T14 and T21 corresponding to the progression of oocytes into primordial follicles.

Oocytes cultured with BPA did not show changes in expression of *Smc1 $\beta$*  and *Sycp1*. BPA up-regulated all the genes implied in DBS generation, signaling and repair except for *Mlh1*. *Spo11*, *H2ax* and *Blm* genes showed a significantly increment from 3 to 5-fold in gene expression ( $p \leq 0.05$ ) but the most affected gen was *Rpa* with an increment of 100-fold ( $p \leq 0.01$ ). *Era*, *Er $\beta$*  and *Erry* genes showed a BPA up-regulation of 2 to 4-fold in all of the culture times ( $p \leq 0.05$ ). *Stra8* and

*Nalp5* did not show statistical differences compared to control-group.

Fibroblasts cultured with BPA-supplemented medium showed a significant increment of ranges of *H2ax*, *Rpa* and *Blm* expression compared to fibroblasts at T0 and fibroblasts cultured with control medium, the increments went from 5.6-fold excess at T7 to 10.9-fold excess at T21 ( $p \leq 0.01$ ). The greater increments were observed in *Rpa*, BPA-exposed fibroblasts showed increments from 24.9-fold excess at T7 to 140.5-fold excess at T21 ( $p \leq 0.001$ ). *Mlh1* gene was down-regulated in all the conditions tested, except by BPA-exposed fibroblasts at T21. *Era*, *Erβ* and *Errγ* genes showed a BPA up-regulation in all of the culture times.

**Conclusions:** Cultured conditions did not modified the gene expression of oocytes. In fact cultured oocytes mimics the gene expression pattern described in un-cultured oocytes. Oocytes exposed to BPA showed an up-regulation of genes implied in DBS generation, signaling and repair (*Spo11*, *H2ax* and *Blm*) except by *Mlh1*. Estrogen receptors *Era*, *Erβ* and *Errγ* also were up-regulated by BPA. BPA-exposed fibroblasts as well as the BPA-exposed oocytes showed an up regulation of genes implied in DBS generation, signaling and repair (*Spo11*, *H2ax* and *Blm*) and estrogen receptors (*Era*, *Erβ* and *Errγ*). Thus, either by a direct effect on the oocytes or by an indirect effect on the stromal ovarian cells, or the combination of both, BPA can change the expression pattern of some genes involved in meiotic processes, which may explain the already known effects of BPA on female germ cells.

## Introduction

In almost all female mammals including the human, meiosis starts during *in utero* development and only concludes when the egg is fertilized. Meiosis is a special kind of cell division characterized by the reductional division of the genome, generating haploid cells after two successive cell divisions following one round of DNA replication. During the fetal life, the first meiotic prophase occurs and then oocytes stay arrested at dictyonema for years or decades. Some important events occurred during the meiotic prophase like meiotic pairing-synapsis and recombination of homologous chromosomes. These processes started with the generation of Double-strand breaks (DSB) along the genome. DSB could be repaired by homologous recombination either as crossovers (COs, when the DSB-flanking regions are exchanged between the homologs) or as non-crossovers (NCOs, when no exchange happens between the homologs). When the exchange between homologous chromosomes is performed, mismatch repair protein MLH1 indicates the places where meiotic recombination (crossovers) occur [1].

Bisphenol A (BPA; 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane; CAS# 80-05-7) is one of the most produced chemical products around the world [2]. This compound is used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins found in metal cans and many other plastic products (toys, drink containers, food packing, eyeglass lenses, dental sealants and medical equipment) [3,4]. The most common way of exposure in human is oral intake. Exposure of the plastics to high temperatures during boiling, microwave cooking or autoclaving causes migration of the compound from canned beverages, foods and baby bottles [5,6,7,8,9,10,11,12]. Exposure to BPA also may occur by workplace-related inhalation during its production [13].

BPA is "weak" endocrinal disruptor with an estrogenic effect. The effect of BPA is mediated by the union of the compound to estrogen receptors, alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) but BPA have a higher affinity to ER $\beta$  (ten times more affinity) [14,15]. BPA also could activate the cell-membrane estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) [16,17]. Reproductive health effects of BPA on humans are controversial but BPA-exposure has been related to obesity, endometrial hyperplasia, recurrent miscarriages, abnormal karyotypes and polycystic ovarian syndrome [18,19,20,21]. BPA has been measured in human amniotic fluid, fetal plasma and the placenta indicating that BPA could cross placental-barrier [22,23,24,25] and affect fetal metabolism increasing the possible toxic effect of BPA on all the fetal organs [24,25,26,27,28,29].

Fetal ovaries exposed to BPA, and thus to developing oocytes, could affect the development of meiotic prophase. Effects of BPA on mouse late-stage oocytes are: retardation to reach metaphase I, telophase I arrest, elongation of the spindle and incapacity to resume meiosis. Mouse oocytes exposed to BPA fail to properly align chromosomes at the spindle equator at metaphase II, present unbalanced chromosome sets and pups obtained from exposed oocytes have highest rates of abortion [30,31,32,33,34]. Mouse oocytes exposed during fetal development (*in utero*) have shown that BPA alters synapsis and meiotic recombination [30]. BPA-exposed oocytes also showed increased levels of the MLH1 *foci* and chiasmata [30,35]. Observed effects in mouse were also observed in *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), worms exposed to BPA had low of number oocytes, a high rate of embryo lethality, abnormal chromosome synapsis and disruption of double-strand breaks repair progression [36]. *C.elegans* BPA-exposed had impaired chromosome segregation during metaphase [36].

Recently, we studied the effects of BPA over human fetal oocytes in culture [37]. Human fetal BPA-exposed oocytes showed a delay of meiotic progression characterized by increments of the oocytes at leptotene, diminution of the percentage of oocytes that reached pachytene and reduction of the viability of the oocytes in culture. Increments of degenerated oocytes were observed for all the BPA-concentrations applied (from 1 $\mu$ M to 30 $\mu$ M). Human BPA-exposed oocytes also showed a significant increment in MLH1 *foci* number (oocytes treated duplicates the normal values). The increments of MLH1 *foci* number were associated to the concentration of BPA applied, in these sense, oocytes cultured with 10 $\mu$ M BPA or higher showed this effect [37].

Global gene expression of human fetal ovaries was described by Hourmard et al., (2009) [38]. Authors reported a temporal change in the gene expression of transcripts involved in meiosis. To date, studies have revealed that the temporal appearance of pairing-synapsis and recombination proteins, at 12<sup>th</sup> week of gestation the expression of *Sycp3*, *Stra8*, *Stag3*, *Text11*, *Text14* and *Spo11* increases and the levels of expression continues stables till week 22 (last gestational age analyzed by Houmard et al., 2009 [38]). Genes known to be involved in meiosis are highly expressed in the mouse ovary, including *Sycp1*, *Msh4* and *Msh5*, and *Dmc1* [39]. Other genes associated with meiosis include *Spo11*, *Stag3*, *Sycp3*, *Tex11*, and *Tex14* [39] Notably, a 100-fold increase of *Stra8* was demonstrated in the mouse fetal ovary coincident with the onset of meiosis (14.5 dpc) and a 50-fold increase of *Nalp5* was observed when oocytes progressed to primordial follicle [39,40].

Previous studies described that this compound could affect genes involved in differentiation, cell growth, apoptosis and DNA repair [22,23,41,42,43,44,45]. In these sense, BPA could affect gene expression of the ovary and uterus. In fact, the effect of BPA on expression of

genes implied in mouse meiosis, was studied by Lawson et al., (2010) [39]. Authors described a significant change in gene expression in the fetal ovaries from BPA-exposed fetuses after 24h. Genes related with meiosis showed an up-regulation after BPA exposition but only *Msh4*, *Dmc1* and *Sycp2*, were statistically different from the control. Although, almost all the studies have involved exposures to rodents and these results cannot be generalized to humans, a typical example is diethylstilboestrol that in rodents had not effect but in human causes vagina cancer [7]. One of the most significant concerns is the suggestion that some of the effects resulting from prenatal and early postnatal exposure to endocrinal disruptors are multigenerational; that is, exposure to one generation increases the likelihood of defects in subsequent generations. Multigenerational effects have now been described in mouse studies of DES [8], BPA [9], and vinclozolin and methoxychlor [10] (for review, see [11]). Although this mechanism currently is thought to be the result of epigenetic changes that are heritable, data remain limited.

The aims of this *vitro* study were to evaluate for the first time the effects of BPA over gene expression of human fetal oocytes during meiotic prophase. To accomplish our objective, genes implied in meiotic pairing-synapsis (*Smc1 $\beta$* , *Sycp1*), DBS generation, signaling and repair (*Spo11*, *Rpa*, *H2ax*, *Mlh1* and *Blm*) markers of meiotic progression (*Stra8* and *Nalp5*) and estrogen receptors (*Era*, *Er $\beta$*  and *Err $\gamma$* ) were analyzed on control-medium and BPA-exposed cultured oocytes. Gene expression evaluation was performed by real-time PCR (RT-PCR). Quantitative gene expression was normalized to values obtained in fresh oocytes (T0), and as an internal control ribosomal sub-unit18s (*h18s*) was used.

## **Material and methods**

### **Biological material**

Twelve ovaries from six fetuses were obtained from the Vall d'Hebron Fetal Tissue Bank, following the rules of the Ethical Committee of the Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. Last menstrual period, ultrasound analysis and foot length were used to calculate gestational age. All of the fetuses were euploid, the karyotype was obtained by prenatal diagnosis and confirmed in the laboratory with the karyotype of cultured fetal ovary *stromal* fibroblasts [46]. Inclusion criteria were: euploid fetuses, gestational age between 18 and 22 weeks, less than 2 hours from the end of the obstetric procedure and the start of the culture process. Cases used are shown in Table 1.

### **Culture of human fetal oocytes**

Ovaries were collected in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco BRL) supplemented with 100IU/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin (both from Gibco BRL) and transported to the laboratory at 4°C. To ensure equal inclusion of cortical and medullar ovarian regions, each ovary was cut transversely, obtaining 4 equal-sized pieces of approximately 3mm x 5mm x 5mm (width x depth x height). Ovaries were cultured following the fetal human oocytes culture technique described elsewhere [47]. Briefly, the four ovary pieces were cut with a McIwain Tissue Chopper (Jed Pella Inc; Redding, CA, USA) into mini-blocks of approximately 1mm x 1mm x 1mm. After that, the mini-blocks were re-suspended in culture medium. Five mini-blocks per well were seeded in a 24-wells cell-culture cluster (Costar, Corning Inc; NY, USA). The mini-blocks were seeded and cultured for seven (T7), fourteen (T14) or twenty-one days (T21) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Previously we analyzed the cytogenetic effect of BPA in cultured fetal human oocytes [37]. To evaluate the gene expression we followed the same methodology. Briefly Control medium used was: D-MEM (Gibco BLR) supplemented with 5µg/ml insulin, 5µg/ml transferrin, 5ng/ml selenium, 100ng/ml stem cell factor (SCF) (all from Sigma; Munich, Germany), 100UI/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin (both from Gibco BLR). BPA-supplemented medium: control medium + BPA 30µM. Bisphenol A, was dissolved in 0.01% dimethyl sulphoxide (DMSO) (all from Sigma; Munich, Germany). Every two days, 50% of the culture medium was changed for fresh medium. Oocytes were removed from the wells as described elsewhere [47].

### **Culture of human fetal fibroblasts**

Fallopian tubes and ovarian *stromal* were disaggregated mechanically in PBS solution [46]. The cellular solution was centrifuged for 7min at 600g and the supernatant removed. The cellular pellet was dissolved in pre-warmed AmnioMax medium (Gibco-Materials and methods Life



Technologies; Paisley, UK) and 1ml of the solution was cultured in Petri dish (Nunc; Roskilde, Denmark) at 37°C and 5%CO<sub>2</sub>. Evolution of the culture was observed every day under an Olympus CK2 inverted microscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany). On the second day of culture, 50% of the medium was removed and replaced with fresh medium. After three days of culture, fibroblasts were observed as a layer, and fibroblasts were removed from the petri dish. Cellular suspension was centrifuged during 10min at 600g. The cellular pellet was re-suspended in AmnioMax medium 0.5ml of solution was cultured in a petri dish, 0.5ml of medium supplemented with BPA was added to obtain the final concentration of 30µM. Fibroblasts were cultured for seven, fourteen and twenty-one days. Culture medium was replaced every two days.

### **RNA extraction and cDNA preparation**

Total RNA was extracted using the Qiagen mini RNA Easy kit in accordance with the manufacturer's instructions (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). The RNA concentration was then determined spectrophotometrically by multi-Detection Microplate Reader (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Osaka, Japan). From 2 ng of total RNA, cDNA was reverse transcribed using oligo (dT) and Superscript III RNase reverse transcriptase (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) as was described by the manufacturer.

### **Real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis**

A two-step real-time RT-PCR was utilized to measure the expression. Gene expression was normalized to *h18s* expression at T0. Quantitative RT-PCR amplification was performed in a Bio-Rad CFX-Real time PCR detection system (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) with SYBR-Premix Ex Taq (TaKaRa-Bio) as previously described [8]. PCR amplification reaction was performed with specific primers as shown in Table 2. After PCR, melting curve analysis was performed to verify specificity and identity of the PCR products. All data were analyzed with the CFX-manager Bio-Rad (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). All the analyzed genes were performed by triplicate for each gene, culture time and culture media applied.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis among sample repeat and inter-sample repeat was performed using U Mann-Whitney Test. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test was applied to compare control oocytes to treated oocytes. Statistical significance for variables in all tests was set at less than or equal to 0.05.

## Results

Recently, we reported a new technique that permit meiotic progression in culture [47] as well as the cytogenetic effects of BPA in cultured human fetal oocyte (Brieño et al., submitted). Thus, to explore the possible molecular mechanisms implied in BPA effect, twelve ovaries were cultured with control medium and BPA-supplemented medium during 7, 14 and 21 days. As a control to genes shared by meiosis and mitosis, ovarian fetal fibroblasts were cultured under the similar conditions to those applied to the culture of oocytes. Genes evaluated includes: transcripts related to cohesion proteins (*Smc1β*), synapsis proteins (*Sycp1*), DNA-DBS generation, signaling and reparation (*Spo11*, *Rpa*, *H2ax*, *Mlh1* and *Blm*), estrogen receptors (*Era*, *Erβ* and *Errγ*) and markers of meiotic progression (*Stra8* and *Nalp5*).

### Gene expression in cultured human fetal oocytes using control medium

Gene expression of meiotic progression markers *Stra8* and *Nalp5*. Genes used as meiotic progression markers, *Stra8* and *Nalp5*, showed increment of transcript expression in cultured oocytes associated to the times of culture. *Stra8*, has been related to the entry of oogonias into meiosis, *Stra8* transcript showed a significant increment of transcript expression in relation to days of culture, in this sense, cultured oocytes had 0.4-fold excess at T7; 1.7-fold excess at T14 and 0.42 fold excess at T21 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 1A).

Transcript expression of *Nalp5*, associated to progression of oocyte to primordial follicle was increased in cultured oocytes. The increment of expression also was related to time of culture; *Nalp5* showed a significantly initial reduction of transcript expression at T7 (0.3-fold less) ( $p \leq 0.5$ ) followed by a significant increment at T14 and T21 ( $p \leq 0.5$ ). The increments went from 1.0-fold excess at T14 to 1.5-fold excess at T21 (Figure 1B).

Cohesion (*Smc1β*) and synapsis (*Sycp1*) genes are not modified by culture conditions along different culture times. Previous reports in fetal ovary showed that gene expression *Smc1β* and *Sycp1* were not modified by gestational age of the fetus [38]. Human fetal oocytes cultured following our technique [47] followed the gene expression pattern described previously by Houmard et al., [38]. *Smc1β* expression did not show differences during the different culture times (T7, T14 and T21) ( $p \geq 0.05$ ). These results could indicate that transcript expression was not modified by the culture (Figure 2A).

SYCP1 is a component of the central element of the synaptonemal complex that appears during meiotic prophase in oocytes. Previous reports indicated that gene expression of *Sycp1* increases after 12 weeks of gestation and stay stable until 24 weeks of gestation [38]. Cultured

oocytes did not show differences among the different culture times indicating that gene expression of *Sycp1* was not affected by culture conditions (Figure 2B). When we compare the gene expression values during culture to those observed in un-cultured oocytes (T0) we could notice some significant increments. These increments went from 1.5-fold excess at T7 to 1.0-fold excess at T21, all of them being statistically different compared to un-cultured oocytes (T0) ( $p \leq 0.5$ ).

*DSB generation (Spo11), signaling (H2ax) and reparation (Rpa, Bml, Mlh1) genes are not modified by culture conditions along the different culture times.* Cultured oocytes did not showed any changes in *Spo11* expression compared to un-cultured oocytes (T0) ( $p \geq 0.05$ ). No differences were observed among the different culture times, indicating that culture conditions did not affect gene expression of *Spo11* (Figure 3A) ( $p \geq 0.05$ ).

Protein H2AX, is related to the signaling of the areas where double-strand breaks have occurred. Cultured oocytes did not show differences of *H2ax* expression among different culture times T7, T14 and T21 (Figure 3B) ( $p \geq 0.05$ ). Compared to un-cultured (T0), cultured oocytes showed an increment of the gene expression of *H2ax*, the increments were, 1-fold excess at T7, 1.5-fold excess at T14 and 3-fold excess at T21 ( $p \leq 0.5$ ).

Protein RPA is involved in DSB reparation, no differences of *Rpa* expression were observed among different times of culture (Figure 3C) ( $p \geq 0.05$ ) indicating that *Rpa* expression, was not modified by culture conditions. When we compared cultured oocytes to un-cultured oocytes (T0), cultured oocytes showed an increment of gene expression of *Rpa* in all the culture times. Increments observed were, 0.8-fold excess at T7, 0.7 fold excess at T14 and 0.6-fold excess at T21 ( $p \leq 0.5$ ). The higher increments were observed at T7 and the decreases at T21.

Protein BLM is involved in the process of reparation of DBS, and is shared by meiosis and mitosis. No differences were observed among different times of culture. Cultured oocytes showed a diminution of *Blm* expression compared to fresh oocytes. Oocytes at T7 and T14 showed a significant diminution of approximately 0.4-fold compared to T0 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 3D).

Protein MLH1 is a marker of meiotic recombination; cultured oocytes did not show differences among different culture times (T7, T14 and T21) ( $p \geq 0.05$ ). Compared to un-cultured oocytes statistical reduction of *Mlh1* expression were from 0.4-fold at T7 to 0.3 at T14 ( $p \leq 0.5$ ) (Figure 3E). These results could indicate that probably the greatest levels of *Mlh1* transcription were before the beginning of culture. Previous reports in mouse and human fetuses had reported that values of *Mlh1* were not modified by the gestational age and stay at stable levels from week 12<sup>th</sup> to week 22<sup>nd</sup> [38,39].

Estrogen receptors genes (*Era*, *Erb* and *Erry*) are not modified by culture conditions along the different culture times. Estrogen receptors are involved in the development of oocytes as well as follicles. In these sense, *Era*, *Erb* and *Erry* expression were evaluated in cultured oocytes. No differences were observed among T7, T14 and T21 for any of the estrogen receptors genes ( $p \geq 0.05$ ). Although, when we compare cultured oocytes to un-cultured oocytes, a significant diminution of *Era* expression was observed in all the culture times. The decrease of *Era* expression was from 0.2-fold at T7 to 0.5-fold at T21 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 4A).

*Erb* and *Erry* expression were increased in all the cultured times. *Erb* expression showed a significant increment of 0.2-fold at T7; 0.6-fold at T14 and 1-fold at T21 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 4B). Cultured oocytes showed an increment of *Erry* expression, the range of increment went from 0.8-fold at T7 to 0.6-fold at T21, all of them being statistical different to values observed in un-cultured oocytes (Figure 4C).

### **Effects of BPA in gene expression of cultured human fetal oocytes**

Meiotic progression markers (*Stra8* and *Nalp5*) genes are not regulated by BPA. As was described for oocytes cultured with control medium, oocytes cultured with BPA-supplemented medium also showed an increment of gene expression of *Stra8* and *Nalp5* when were compared to un-cultured oocytes (T0). In this sense, *Stra8* showed an increment of expression after BPA-exposure, observed increment was from 0.5-fold at T7; 2.0-fold at T14 and 0.8-fold at T21, all of them being statistical different from un-cultured oocytes ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 1A).

Similarly, *Nalp5* was also over expressed in cultured BPA-exposed oocytes. The increment of expression was related to time of culture, in these sense after an initial "normal" level of expression at T7, a significant increment was observed at T14 and T21. The increments went from 0.2-fold at T14 to 0.8-fold at T21 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 1B). In all the culture times (T7, T14 and T21), no statistical differences were observed among oocytes cultured with control medium and those cultured with BPA-supplemented medium. Oocytes cultured with BPA-supplemented media followed the *Stra8* and *Nalp5* gene expression pattern observed in oocytes cultured with control medium. This data indicates that, at least in culture, the possible entry of oogonias into meiosis and the development of primordial follicle were not affected by BPA.

Cohesion (*Smc1 $\beta$* ) and synapsis (*Sycp1*) genes are not regulated by BPA. BPA-exposed cultured oocytes, did not showed differences between oocytes cultured with control medium at the different culture times (T7, T14 and T21) ( $p \geq 0.05$ ). These results could indicate that *Smc1 $\beta$*  gene, was not modified by BPA-exposure. A diminution of *Smc1 $\beta$*  expression in all the culture times were observed when it was compared to values observed in un-cultured oocytes. The observed significant

reduction of gene expression was approximately 0.3-fold less at T7, T14 and T21 compared to T0 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 2A). Cohesins are synthesized before the beginning of meiosis, so the reduction could be related to the diminution of oogonias that entry into meiosis.

*Sycp1* expression was increased in oocytes cultured with BPA-supplemented than those observed in un-cultured oocytes (T0) ( $p \geq 0.05$ ). Oocytes cultured with BPA-supplemented medium showed an increment of 1.3-fold excess at T7, 1.4-fold excess at T14 and 0.9 fold excess at T21, all of them being significantly different to T0 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 2B). In contrast, no differences between oocytes cultured with control medium or BPA-supplemented medium were observed for any of the times of culture. These results could suggest that BPA did not regulate *Sycp1* expression.

*BPA up-regulated the expression of genes implied in DSB generation (Spo11), signaling (H2ax) and repair (Rpa, Bml).* BPA-exposed oocytes showed an increment of gene expression of *Spo11*, *H2ax*, *Rpa* and *Bml* when it was compare to un-cultured oocytes (T0) and to oocytes cultured with control medium. *Spo11* increments in BPA-exposed oocyte went from 0.5-fold excess at T7 to 1.5-fold excess at T21, all of them being statistical different from un-cultured oocytes (T0) ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 3A). The same trend was observed when oocytes cultured with BPA-supplemented medium were compared with those cultured with control-medium, the observed increments went from 0.7-fold excess at T7 to 1.1-fold excess at T21 ( $p \leq 0.05$ ), indicating that BPA could induce DSB's by increment of *Spo11* expression.

Up-regulation of *H2ax* in BPA-exposed oocytes was also observed. Compared to un-cultured oocytes, BPA-exposed oocytes showed a significant increments of expression with ranges from 5.5-fold excess at T7 to 10.9-fold excess at T21 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 3B). Up-regulation of *H2ax* by BPA was also observed when compared with oocytes cultured with control-medium. Observed increments went from 4.4-fold excess at T7 to 8.7-fold excess at T21, all of them being statistically significant ( $p \leq 0.05$ ). Increments in DSB generated by SPO11, so the over-expression of *H2ax* could be related to activation of reparation pathways, after SPO11 activity on DNA.

*Rpa* is related to reparation of DSB, oocytes cultured with BPA-supplemented medium showed an up-regulation of *Rpa* compared to un-cultured oocytes and to oocytes cultured with control-medium. For both, fresh oocytes and oocytes cultured with control-medium, significant increments of 24.9-fold excess at T7, 30.5-fold excess and 98.5-fold excess at T21, were observed ( $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  and  $p \leq 0.001$  respectively) (Figure 3C).

*Blm* gene expression did not show differences compared to fresh oocytes, but when we compared to oocytes cultured with control media an increment from 0.3-fold excess to 0.6-fold

excess were observed. The up-regulation of *Blm* by BPA only was statistically significant at T14 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 3D).

Meiotic recombination marker gene (*Mlh1*) is not regulated by BPA. Previous studies in mouse and human [35,39,47] has described an increment of meiotic points marked by MLH1 in BPA-exposed oocytes. We analyzed the *Mlh1* gene expression of oocytes cultured with control-medium and BPA-supplemented medium. *Mlh1* was down-regulated in all the conditions tested, the ranges of diminution went from 0.4-fold less at T7 to 0.30-fold less at T21 (Figure 3E). Statistical differences were observed at T7 and T14 for both culture media. Surprisingly, after twenty-one days of culture the values of *Mlh1* expression were closer to the values observed in un-cultured oocytes (T0).

*Era*, *Erβ* and *Erry* are up-regulated by BPA. Oocytes cultured with BPA-supplemented medium showed an up-regulation *Era* compared to un-cultured oocytes as well as oocytes cultured with control media. The range of increments went from 0.1 fold excess at T7 to 0.31 fold excess at T21 (Figure 4A). Only, at T14 and T21, the increments were statistically significant ( $p \leq 0.05$ ). Differences in gene expression also were significant at T14 and T21, in oocytes cultured with BPA-supplemented medium compared to those cultured with control-medium ( $p \leq 0.05$ ).

*Erβ* is highly expressed in fetal human oocytes at 20 weeks of gestation, oocytes exposed to BPA in culture showed a significant increment of 1.5-fold excess at T7, 2.3-fold excess at T14 and 2.9-fold excess at T21 compared to un-cultured oocytes ( $p \leq 0.01$ ) (Figure 4B). BPA-exposed oocytes showed a statistically increment from 1-fold excess at T7 to 2-fold excess at T21 to control-medium culture oocytes ( $p \leq 0.01$ ) (Figure 4B).

Finally BPA action has been related to ERR $\gamma$  activation [17,48]; in these sense oocytes cultured with control-medium showed an increment of *Erry*, but the increments observed in BPA-exposed oocytes were significantly greater. BPA-exposed oocytes showed significant increments of *Erry* expression from 2.2-fold excess at T7 to 4.3 fold excess at T21, compared to un-cultured oocytes ( $p \leq 0.001$ ) (Figure 4C). Differences among control-medium and BPA-supplemented medium also were observed, BPA-exposed oocytes showed significant increments of *Erry* expression. The increments went from 1.3-fold excess at T7 to 3.6-fold excess, compared to oocytes cultured with control-medium ( $p \leq 0.01$ ).

### **Genes implied in DSB signaling (*H2ax*) and reparation (*Rpa*, *Bml*, *Mlh1*) are up regulated in cultured human fetal fibroblasts exposed to BPA**

As was mentioned above, some of genes implied in meiosis are shared with mitosis. Thus we evaluated the gene expression of these genes in fibroblasts from ovarian *stromal* and fallopian

tubes. The oocyte culture method used implies the use of mini-blocks of fetal ovary, in these blocks fibroblasts from ovarian stromal and fallopian tubes could be observed. In order to evaluate if the values of gene expression from culture oocytes were not altered by a possible fibroblast contamination the evaluation of gene expression of fibroblast was performed. Gene expression of T0 was evaluated from un-cultured fibroblasts obtained from fallopian tubes and ovarian *stromal*.

Fibroblasts cultured with control medium showed an increment of *H2ax* expression, from 1.2-fold excess at T7 to 2.3-fold excess at T21, all of them being statistically different to un-cultured fibroblasts T0 (un-cultured fibroblasts obtained from fallopian tubes) ( $p \leq 0.05$ ). Fibroblasts cultured with BPA-supplemented medium showed a significant increment of ranges of *H2ax* expression compared to fibroblasts at T0, the increments went from 5.6-fold excess at T7 to 10.9-fold excess at T21 ( $p \leq 0.01$ ) (Figure 5A). Statistically significant differences were also observed when fibroblasts cultured with control-media were compared to fibroblasts cultured with BPA-supplemented medium ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 5A).

The same trend was observed for *Rpa*, fibroblasts cultured with control medium show an up-regulation in culture. Statistically significant increments were observed at all the culture times, these went from 0.8-fold excess at T7 to 7.6-fold excess at T21 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 5B). BPA-exposed fibroblasts showed also statistically significant increments with a range of 24.9-fold excess at T7 to 140.5-fold excess at T21 ( $p \leq 0.001$ ). Statistical differences were observed between fibroblasts cultured with control medium and those cultured with BPA-supplemented medium ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 5B).

*Blm* were down-regulated in fibroblasts cultured with control medium compared to fibroblasts at T0, but differences between them were not greatly enough to be significant. Fibroblasts cultured with BPA-supplemented medium showed an increment of *Blm* expression at T14 and T21 compared to fibroblasts at T0 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 5C). Statistical differences were observed between fibroblasts cultured with control medium and those cultured with BPA-supplemented medium at T14 and T21 ( $\leq 0.05$ ) (Figure 5C).

As was described, in oocytes, *Mlh1* gene was down-regulated in cultured fibroblasts *Mlh1* also was down-regulated in all the conditions tested (Figure 5D), except by BPA-exposed fibroblasts at T21. BPA-exposed fibroblasts at T21 showed a significant up-regulation with an increment of gene expression of 0.9-fold excess compared to T0 and control-medium ( $\leq 0.05$ ).

### ***Era*, *Erβ* and *Erry* are up-regulated by BPA in cultured human fetal fibroblasts**

Fibroblasts cultured with control-medium did not show statistically significant differences

compared to T0 in *Era* expression. Fibroblasts cultured with BPA-supplemented media showed an up-regulation compared to T0, with increments in gene expression from 2.4-fold excess at T7 to 3.4-fold excess at T21, all of them being statistically different ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 6A). Differences between fibroblasts cultured control-medium and BPA-supplemented medium were observed at T14 and T21 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 6A).

For *Erβ*, no statistical differences were observed among fibroblasts at T0 compared to fibroblast cultured with control-medium. Fibroblasts cultured with BPA-supplemented medium showed an up-regulation of *Erβ*, compared to T0 and fibroblasts cultured with control-medium. The significant increments went from 1.2-fold excess at T7 to 2.0-fold excess at T21 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 6B).

Finally gene expression of *Errγ* was also up-regulated by BPA. Fibroblasts cultured with control-medium did not show statistical differences compared to T0. BPA-exposed fibroblasts showed an up-regulation with increments from 3.2-fold excess at T7 to 3.3-fold excess at T21, all of them being statistically different to T0 ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 6C).



## Discussion

Recently, we reported the cytogenetic effects of BPA exposition in cultured human fetal oocytes. BPA-exposed oocytes showed lower viability in culture, delay in meiotic progression and increased levels of meiotic recombination [37], so we decided to evaluate in BPA-exposed cultured oocytes the gene expression during prophase. This work shows for the first time the gene expression of human fetal oocytes in culture, and gene expression of cultured BPA-exposed oocytes

### **Cultured oocytes follow the time progression gene expression of human fetal un-cultured fetal oocytes**

Global gene expression studies [14, 44–46] via microarray analysis have a critical role in furthering our understanding of gonadal function before and after birth. With the generation of global gene expression data sets comes the immediate desire to perform direct comparisons between species. Improvements in technology have alleviated the need for the copious amount of RNA that was originally required to complete such a study. Previous studies performed fetuses from mouse and human [38,39] revealed the relationship between gestational age and gene expression. In these sense, genes used as a meiotic progression markers as a *Stra8* and *Nalp5*, showed an increment in gene expression along the culture. Previously, we demonstrated that oocytes in culture progress along the meiosis in culture, with increments in the percentage of oocytes at leptoneuma and pachyneuma [47]. In this way, the increments of oocytes could be related to “new” oogonias that initiate meiosis. *Stra8*, has been related to the entry of oogonias into meiosis, so if we observe an up-regulation of *Stra8* expression during the culture it could indicate the entry of these “new” oogonias into meiosis *in vitro* [38,39,49] An important observation needs to be clarify, and is the fact that the increments of *Stra8* reaches its highest levels at T14 and then decreases, in opposition *Nalp5*, associated to progression of oocyte to primordial follicle which reaches the highest levels at T21. These observations indicated that firstly a biggest number of oocytes could entry in to meiosis in culture and many of these oocytes progress and could form a primordial follicle.

In contraposition, *Smc1β* expression was not affected by time of culture, indicating the highest levels of gene expression of *Smc1β* could be before the beginning of the culture. It is important to mention that SMC1β is supposed to be loaded on the chromosomes by the time of DNA replication, during pre-meiotic S phase. In opposition to phenomena observed with *Smc1β*, *Sycp1* expression increased in culture. Increments of *Sycp1* could be related to the entry of oogonias into meiosis. During meiosis is necessary to complete synapsis and SYCP1 is necessary to accomplish it.

On the other hand, genes implied in the DSB generation (*Spo11*), signaling (*H2ax*) and reparation (*Rpa*, *Bml*, *Mlh1*) were not modified by the culture time, in agreement with previous reports in mouse and human fetuses [38,39].

Estrogen receptors are involved in the development of oocytes as well as follicles. Cultured oocytes showed a diminution of gene expression of *Era* and over-expression of *Erβ* and *Erry*. Previous reports showed that the presence of estrogen receptors in fetal ovary is related to gestational age. *Erβ* is expressed by human ovary before week 20<sup>th</sup> but *Era* is only observed after week 20<sup>th</sup>, so the diminution of *Era*, could be related to the gestational age of the ovaries cultured as well as the entry of new oogonias in to meiosis [50,51].

### **DSB generation (*Spo11*), signaling (*H2ax*) and repair (*Rpa*, *Bml*) are impaired by BPA but *Mlh1* is not**

In a previous study [37], we described the cytogenetic effect of BPA. BPA has been related to induction of double-strand breaks in MCF cells after exposure to BPA, [44] increase of DSB markers, like  $\gamma$ H2AX which co-localized with other DNA repair proteins like BLM (Bloom helicase) [44,45,52,53]. Our results showed, that genes involved in DSB generation, signaling and repair were up-regulated in BPA-exposed cultured oocytes in agreement with previous studies[44,54,55,56,57]. The increments of *Spo11*, *Rpa* and *H2ax* expression could explain the increments of recombination observed in the cytogenetic analyses except by *Mlh1*.

MLH1 is considered the marker of chromosomal recombination, and in cultured oocytes exposed to BPA, the number of MLH1 *foci* duplicates the values described for control oocytes [37] We expected to found an up-regulation of *Mlh1* by BPA, but it was not observed. The discussion is on the table, the cytogenetic results are not in agreement with gene expression results. We believe that probably, the highest levels of gene expression and synthesis of all proteins related to DNA-damage repair, including MLH1, is previous to week 18<sup>th</sup>. In this sense the oocyte could have some kind of protein reservoir. When the damage of BPA is produced the protein is used by the oocyte. In this sense, more studies need to be performed to try to understand the cell pathways implied.

### **BPA up-regulated *Era*, *Erβ* and *Erry* in human fetal oocytes in culture**

The effect of BPA has been related to its activity as an ER $\beta$  antagonist [30,35,36,58]. Oocytes cultured with BPA-supplemented medium showed an increment of the gene expression of all the estrogenic receptors. The up-regulation of all the estrogen receptor genes could be related to an imbalance in the intracellular responses, in this sense the blocking of the ER $\beta$  by BPA could cause a feedback positive to ER $\alpha$  and ER $\gamma$ . The cell will try to synthesize more receptors as a response to

the inactivity of ER $\beta$  caused by the antagonist action of BPA and gene expression could be increased. BPA is the "natural" ligand of For ERR $\gamma$ , the positive signal induces an over expression of the receptor as was described in placenta [16,59,60,61]. Definitely more studies need to be performed to establish the relations between BPA and the estrogen receptors, in human fetal oocytes.

### **Up regulation of *H2ax*, *Rpa* and *Bml* by BPA in human fetal fibroblasts**

BPA-exposed fibroblasts showed an up-regulation of *H2ax*, *Rpa* and *Bml*. The observed effect is in agreement with previous studies performed in fibroblasts from different organs [5,36,59,62,63]. As was mentioned above, these genes are shared in mitosis and meiosis, up regulation performed by BPA indicates the possible regulatory effect the compound over these genes in both kind of cell division. The differences observed between the cultures of oocytes and fibroblasts could not explain the cellular pathways implied in the effect of BPA, but evidently shows its effect over cell division. In fact, the overexpression of Rpa was higher in fibroblasts than in oocytes, indicating that probably BPA could induce a greater response in somatic cells than in germinal cells

### **BPA up-regulated *Era*, *Er $\beta$* and *Erry* in human fetal fibroblasts**

BPA-exposed fibroblasts showed an up-regulation of the genes of estrogen receptors. BPA is considered as an ER $\beta$  antagonist, but the effects of the compound are related to the tissue and cells analyzed, we expected that fibroblast from ovarian *stromal* and Fallopian tubes could have a different response to BPA compared to oocytes. The results obtained followed the same trend in both kinds of cells indicating that probably in the ovary as a tissue (fibroblasts and oocytes included) the effects of BPA are related to the same cellular response, but definitely more studies need to be performed to explore the different pathways implied in the effects of BPA in ovary.

## **Conclusions**

Bisphenol A induces the over expression of *Spo11*, *H2ax*, *Rpa* and *Blm* in human fetal ovarian cultures. All of these genes are implied in the double-strand break generation, signaling and repair during meiosis but some of them are shared with mitosis (*H2ax*, *Rpa* and *Blm*). The up regulation caused by BPA could disrupt the cell cycle and in consequence the cell survival and differentiation. Ovarian pieces exposed to BPA also showed an up-regulation of estrogen receptors *Era*, *Er $\beta$*  and *Erry*, which was also observed in ovarian fibroblasts indicating that these receptors are implied in the effects of BPA in ovary.

The obtained results show the effects of BPA on the fetal ovary as an organ, since most likely both oocytes and fibroblast are affected by the exposition to BPA in culture. Nevertheless, it is important to remember that at the end of meiotic prophase, oocytes establish a close relationship with the ovarian stromal cells to form the primordial follicles, which are the source for gamete precursors in the female. Therefore, effects of BPA to the stromal cells have to be considered when studying the effect of BPA on the ovarian function. Thus, either by a direct effect on the oocytes or by an indirect effect on the stromal ovarian cells, or the combination of both, BPA can change the expression pattern of some genes involved in meiotic processes, which may explain the already known effects of BPA on female germ cells [36,38,39,43,53].

## **Acknowledgments**

This work would have been impossible without the support of the clinicians and biologists of the Fetal Tissue Bank, Pathology and Gynecology Departments of the Hospital de la Vall d ' Hebron, Barcelona, Spain, as well as all of the members of the Department of Physiology and Pharmacology of the Medicine School of San Luis Potosí, México, and the members of the Unit of Cell Biology and Medical Genetics of the Medicine School of UAB, Barcelona. This manuscript was proofreading by Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking Instructor of English of Universitat Autònoma de Barcelona.

## **Financial disclosure**

Financial support for this study was provided by grants from the Ministerio de Educación y Cultura (BFU2006-12951) (Spain), CIDEM (ACC1ó) Generalitat de Catalunya (Spain), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107) (Spain), Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación Internacional (AECI, Spain) (#0000447445), National Council of Science and Technology (CONACYT, México) (#166825), National Council of Public Education (SEP, México) (SEP-2004-COI-4591).

**Table 1.** Used cases.

Case	GW(weeks)	FL (cm)	Weight (gr)	Diagnosis	Karyotype
V160	22	3.7	450	Vermix agenesis	46,XX
V175	22	4.5	687	Renal malformation	46,XX
V176	21	3.4	380	Nasal hypoplasia	46,XX
V178	22	4.1	509	Corpus callosum agenesis	46,XX
V181	21	4.0	500	Adenomatosis	46,XX
V183	21	3.9	475	Diaphragmatic hernia	46,XX

GW gestational weeks

FL: feet length in cm

**Table 2.** Used primers.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Stra8</i>	CCTCAAAGTGGCAGGTTCTGAA	TCCTCTAAGCTGCTTGCATGC
<i>Nalp5</i>	CGAGGTCATGAGAGAACCATCTT	CACGCGGCGGTGAGA
<i>Mlh1</i>	GGGCTGTGTGAATCCTCAGT	TTCCTCTGTCCAGCCACTCT
<i>Spo11</i>	ACATTTGAGCGGCTCCTAGA	TCTATGCCATGTGGATCAGC
<i>Rpa</i>	GGGATTGATGACCTCGAGAA	AGTCACCACCTTCCCAGATG
<i>Sycp1</i>	GGTTCTTTCTGTTGCCCTCA	TGATCTCGGTGGTACGAACA
<i>Blm</i>	GCTGGAAGGAGTTGGAGTTG	AAATCCCACTGCTGAAACAA
<i>H2ax</i>	GGCAGCCCAGATTTTTATCA	GCTCGGCAGGAGTTACAGAC
<i>Era</i>	GGAGCTGAATCCAGAAACCA	AGCACGGATTCATGGTCTC
<i>Erβ</i>	AGAGACCCTGAAGAGGAAGC	GCTTCTTTTAAAAAAGGCCT
<i>Errγ</i>	TGGAGATCTTCGACATGCTG	GCCATCAGGTGGATCAAAGT
<i>h18s</i>	GTGGAGCGATTTGTCTGGTT	CGGACATCTAAGGGCATCAC

## References

1. Hoffmann ER, Borts RH (2004) Meiotic recombination intermediates and mismatch repair proteins. *Cytogenet Genome Res* 107: 232-248.
2. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 24: 139-177.
3. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM (2009) Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30: 75-95.
4. Vandenberg LN, Chahoud I, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G (2010) Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118: 1051-1054.
5. Willhite CC, Ball GL, McLellan CJ (2008) Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11: 69-146.
6. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, et al. (2007) In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol* 24: 178-198.
7. Guobing X JS, Guohua H, Lixing Z, Tongjun W, Zhijun Z. (2005) Investigation into serum BPA and sex hormone levels of workers in epoxy resin manufacturing. *J Environ Occup Med* 22: 295-298.
8. Imanaka M, Sasaki K, Nemoto S, Ueda E, Murakami E, et al. (2001) [Determination of bisphenol A in foods using GC/MS]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42: 71-78.
9. Goodson A, Robin H, Summerfield W, Cooper I (2004) Migration of bisphenol A from can coatings--effects of damage, storage conditions and heating. *Food Addit Contam* 21: 1015-1026.
10. Onn Wong K, Woon Leo L, Leng Seah H (2005) Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles. *Food Addit Contam* 22: 280-288.
11. Biles JE, White KD, McNeal TP, Begley TH (1999) Determination of the diglycidyl ether of bisphenol A and its derivatives in canned foods. *J Agric Food Chem* 47: 1965-1969.
12. Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray LE, Jr., Hayward SW, et al. (2008) NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 83: 157-395.
13. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, et al. (2010) Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118: 1055-1070.
14. Pennie WD, Aldridge TC, Brooks AN (1998) Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements. *J Endocrinol* 158: R11-14.
15. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA (1998) The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19: 253-286.
16. Horard B, Vanacker JM (2003) Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand. *J Mol Endocrinol* 31: 349-357.
17. Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima A, et al. (2008) Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect* 116: 32-38.
18. Takeuchi T, Tsutsumi O (2002) Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 76-78.

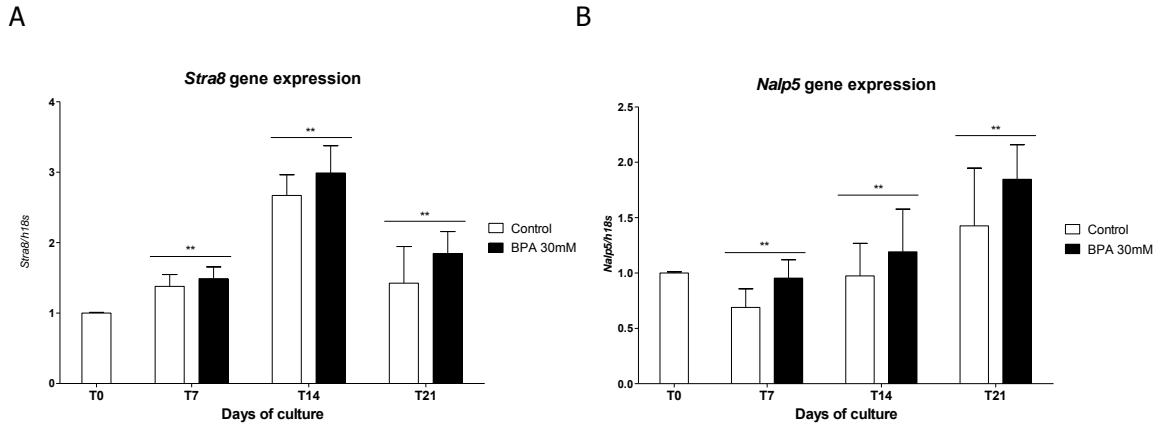


19. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Takai Y, Taketani Y (2004) Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 51: 165-169.
20. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K (2005) Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 20: 2325-2329.
21. Yang M, Park MS, Lee HS (2006) Endocrine disrupting chemicals: human exposure and health risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 24: 183-224.
22. Lemmen JG, Arends RJ, van der Saag PT, van der Burg B (2004) In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and bisphenol A. *Environ Health Perspect* 112: 1544-1549.
23. Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, et al. (2002) Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* 16: 735-739.
24. Schonfelder G, Friedrich K, Paul M, Chahoud I (2004) Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia* 6: 584-594.
25. Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, et al. (2002) Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 110: A703-707.
26. Engel SM, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff MS (2006) Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 21: 110-112.
27. Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, et al. (2003) Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111: 309-319.
28. Mariscal-Arcas M, Rivas A, Granada A, Monteagudo C, Murcia MA, et al. (2009) Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem Toxicol* 47: 506-510.
29. Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R (2007) Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66: 1160-1164.
30. Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, et al. (2003) Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 13: 546-553.
31. Can A, Semiz O, Cinar O (2005) Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod* 11: 389-396.
32. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Cukurcam S, Sun F, Pacchierotti F, et al. (2008) Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutat Res* 651: 82-92.
33. Lenie S, Cortvrindt R, Eichenlaub-Ritter U, Smitz J (2008) Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutat Res* 651: 71-81.
34. Mlynarcikova A, Nagyova E, Fickova M, Scsukova S (2009) Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol In Vitro* 23: 371-377.
35. Susiarjo M, Hassold TJ, Freeman E, Hunt PA (2007) Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet* 3: e5.
36. Allard P, Colaiacovo MP (2010) Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20405-20410.
37. Brieno-Enriquez M (2011) (submitted) Human meiotic progression and recombination are affected by bisphenol A during in vitro human oocyte development.

38. Houmard B, Small C, Yang L, Naluai-Cecchini T, Cheng E, et al. (2009) Global gene expression in the human fetal testis and ovary. *Biol Reprod* 81: 438-443.
39. Lawson C, Gieske M, Murdoch B, Ye P, Li Y, et al. (2010) Gene expression in the fetal mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A. *Biol Reprod* 84: 79-86.
40. Fowler PA, Flannigan S, Mathers A, Gillanders K, Lea RG, et al. (2009) Gene expression analysis of human fetal ovarian primordial follicle formation. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1427-1435.
41. Naciff JM, Jump ML, Torontali SM, Carr GJ, Tiesman JP, et al. (2002) Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicol Sci* 68: 184-199.
42. Miyamoto T, Shiozawa T, Kashima H, Feng YZ, Suzuki A, et al. (2006) Estrogen up-regulates mismatch repair activity in normal and malignant endometrial glandular cells. *Endocrinology* 147: 4863-4870.
43. Daftary GS, Taylor HS (2006) Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* 27: 331-355.
44. Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, Shimamoto A, Furuichi Y (2006) DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol Pharm Bull* 29: 206-210.
45. Iso T, Futami K, Iwamoto T, Furuichi Y (2007) Modulation of the expression of bloom helicase by estrogenic agents. *Biol Pharm Bull* 30: 266-271.
46. Roig I, Vanrell I, Ortega A, Cabero L, Egozcue J, et al. (2003) The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. *Stromal ovarian culture cytogenetic diagnosis. Cytotechnology* 41: 45-49.
47. Brieno-Enriquez MA, Robles P, Garcia-Cruz R, Roig I, Cabero L, et al. (2010) A new culture technique that allows in vitro meiotic prophase development of fetal human oocytes. *Hum Reprod* 25: 74-84.
48. Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, et al. (2006) Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett* 167: 95-105.
49. Tedesco M, La Sala G, Barbagallo F, De Felici M, Farini D (2009) STRA8 shuttles between nucleus and cytoplasm and displays transcriptional activity. *J Biol Chem* 284: 35781-35793.
50. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, et al. (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286: 2328-2331.
51. Vaskivuo TE, Maentausta M, Torn S, Oduwole O, Lonnberg A, et al. (2005) Estrogen receptors and estrogen-metabolizing enzymes in human ovaries during fetal development. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3752-3756.
52. Rockmill B, Fung JC, Branda SS, Roeder GS (2003) The Sgs1 helicase regulates chromosome synapsis and meiotic crossing over. *Curr Biol* 13: 1954-1962.
53. Wu L, Hickson ID (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426: 870-874.
54. Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, McDonald D, Hendzel M, et al. (2006) Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *EMBO J* 25: 222-231.
55. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, et al. (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296: 922-927.
56. Myers JP, vom Saal FS, Akingbemi BT, Arizono K, Belcher S, et al. (2009) Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 117: 309-315.
57. Oakley GG, Patrick SM (2010) Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Front Biosci* 15: 883-900.

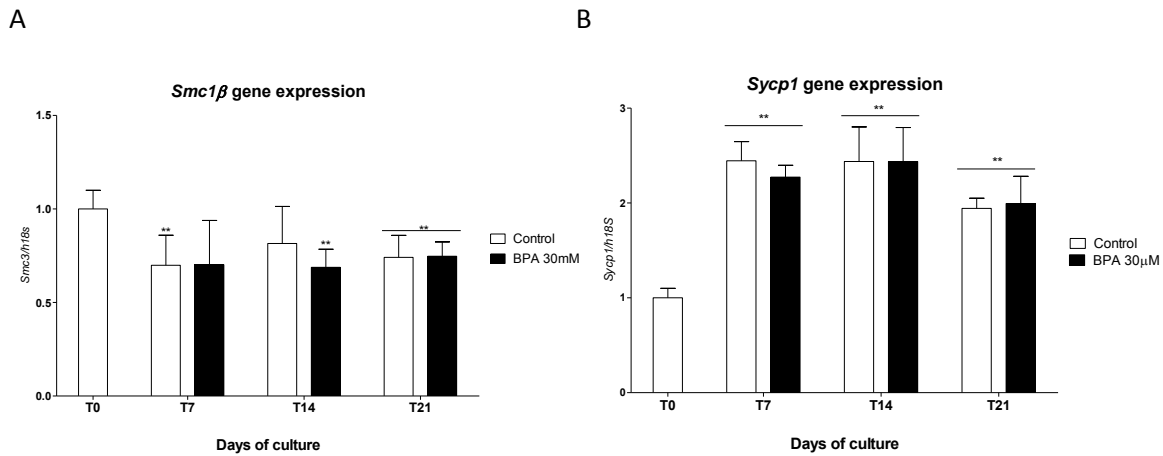
58. Hunt PA, Susiarjo M, Rubio C, Hassold TJ (2009) The bisphenol A experience: a primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction. *Biol Reprod* 81: 807-813.
59. Avissar-Whiting M, Veiga KR, Uhl KM, Maccani MA, Gagne LA, et al. (2010) Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod Toxicol* 29: 401-406.
60. Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P (2009) Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 117: 1053-1058.
61. Huppunen J, Aarnisalo P (2004) Dimerization modulates the activity of the orphan nuclear receptor ERRgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 964-970.
62. Lehmann L, Metzler M (2004) Bisphenol A and its methylated congeners inhibit growth and interfere with microtubules in human fibroblasts in vitro. *Chem Biol Interact* 147: 273-285.
63. Washington W, Hubert L, Jones D, Gray WG (2001) Bisphenol a binds to the low-affinity estrogen binding site. *In Vitro Mol Toxicol* 14: 43-51.

Figure 1. Meiotic markers gene expression in oocytes cultured with control-medium and BPA-supplemented medium



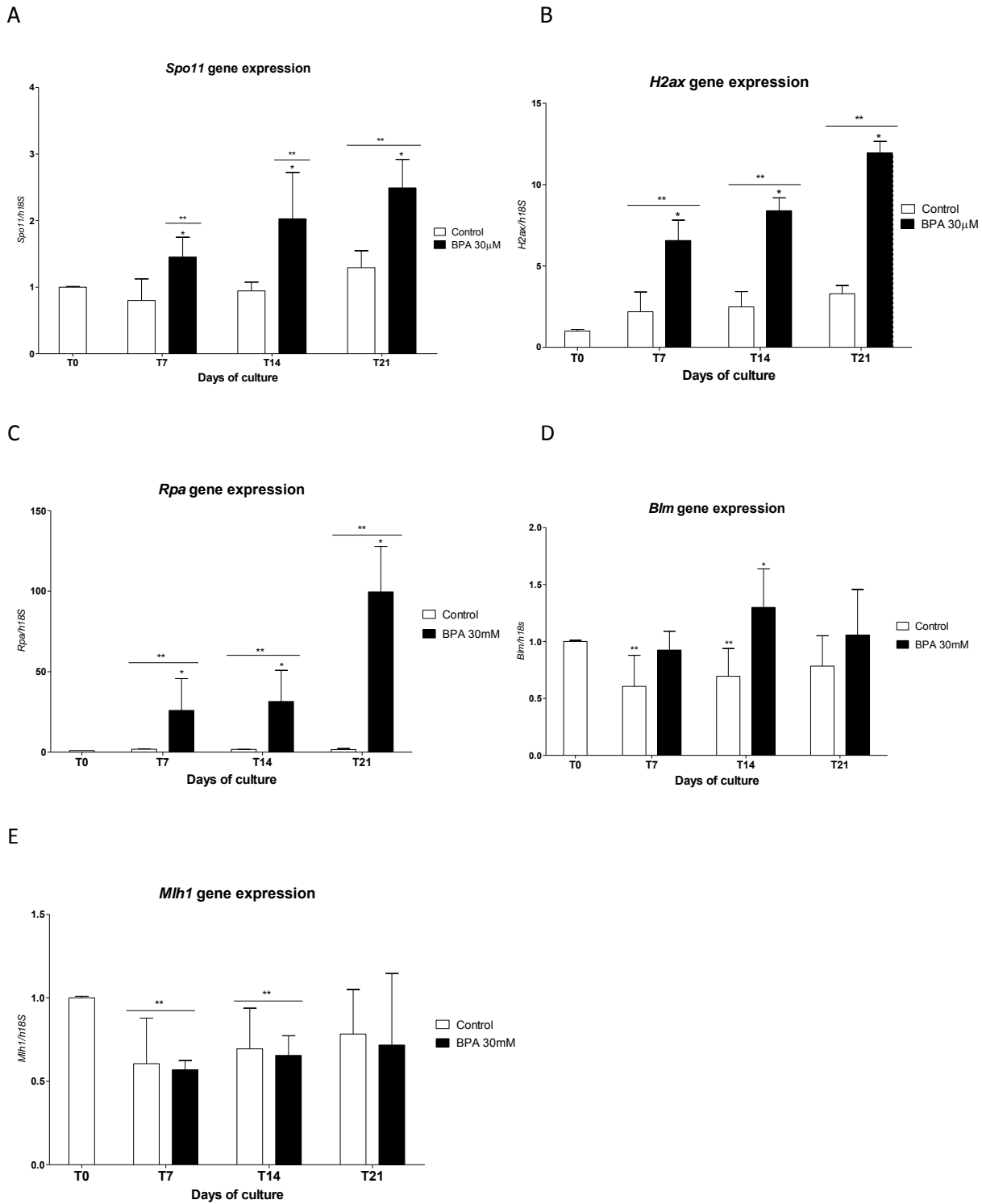
\*\* Statistically different compared to uncultured oocytes (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )  
 \* Statistically different compared to control –medium (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

Figure 2. Expression of genes implied in cohesion and synapsis in oocytes cultured with control-medium and BPA-supplemented medium..



\*\* Statistically different compared to un-cultured oocytes (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )  
 \* Statistically different compared to control –medium (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

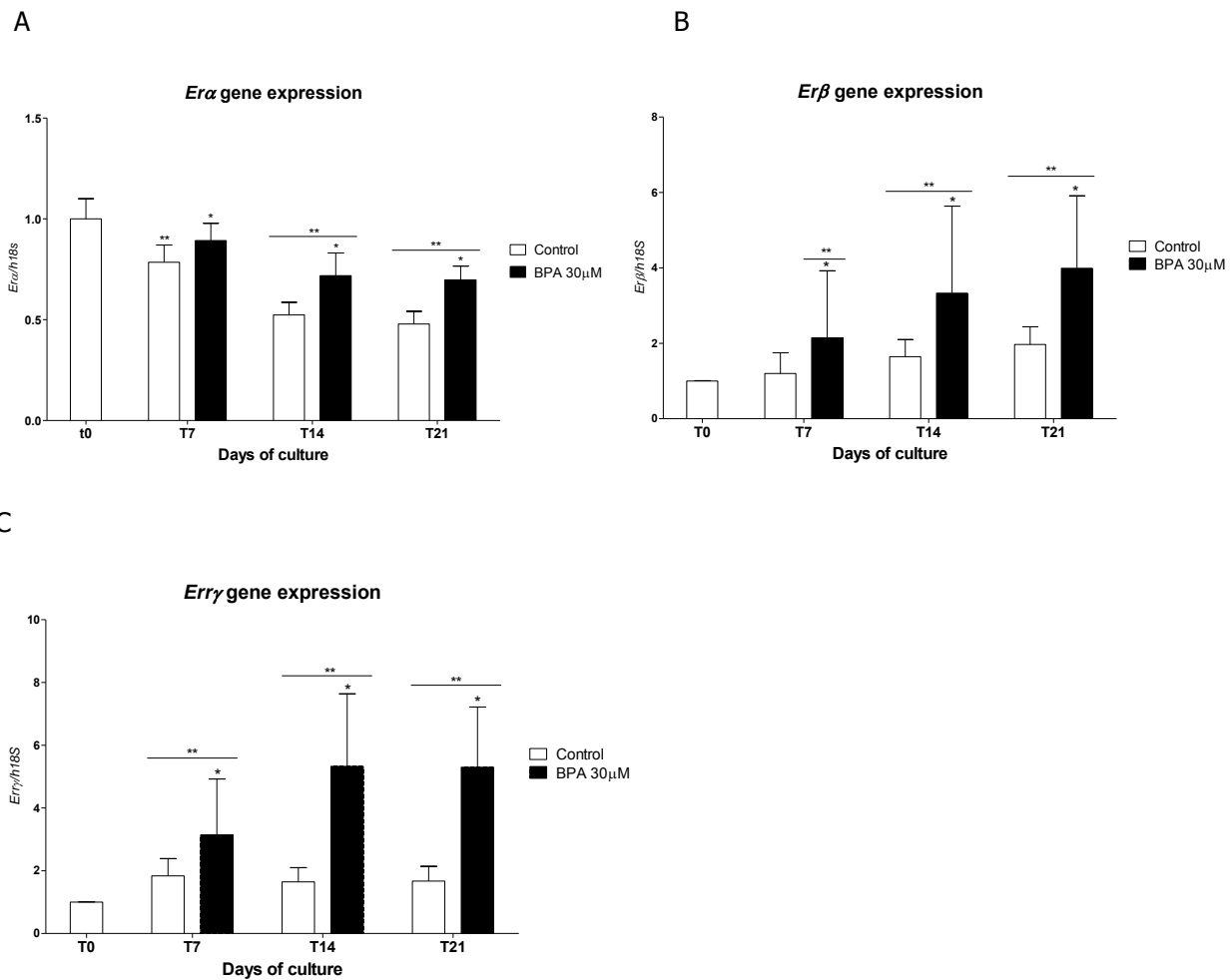
Figure 3. Expression of genes implied in DSB generation, signaling and repair in oocytes cultured with control-medium and BPA-supplemented medium.



\*\* Statistically different compared to un-cultured oocytes (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

\* Statistically different compared to control –medium (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

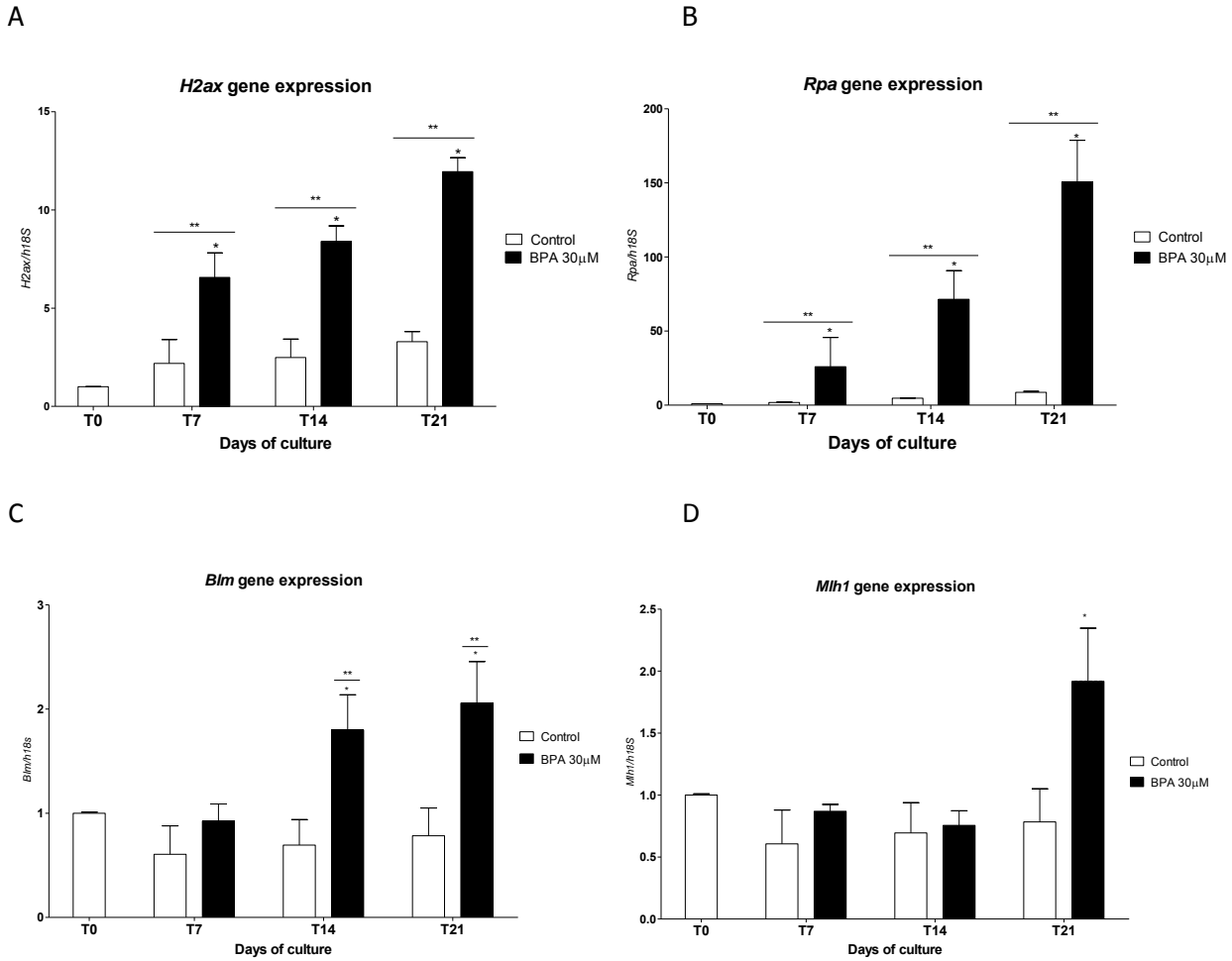
Figure 4. Gene expression of estrogen receptors in human fetal oocytes in oocytes cultured with control-medium and BPA-supplemented medium.



\*\* Statistically different compared to un-cultured oocytes (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

\* Statistically different compared to control –medium (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

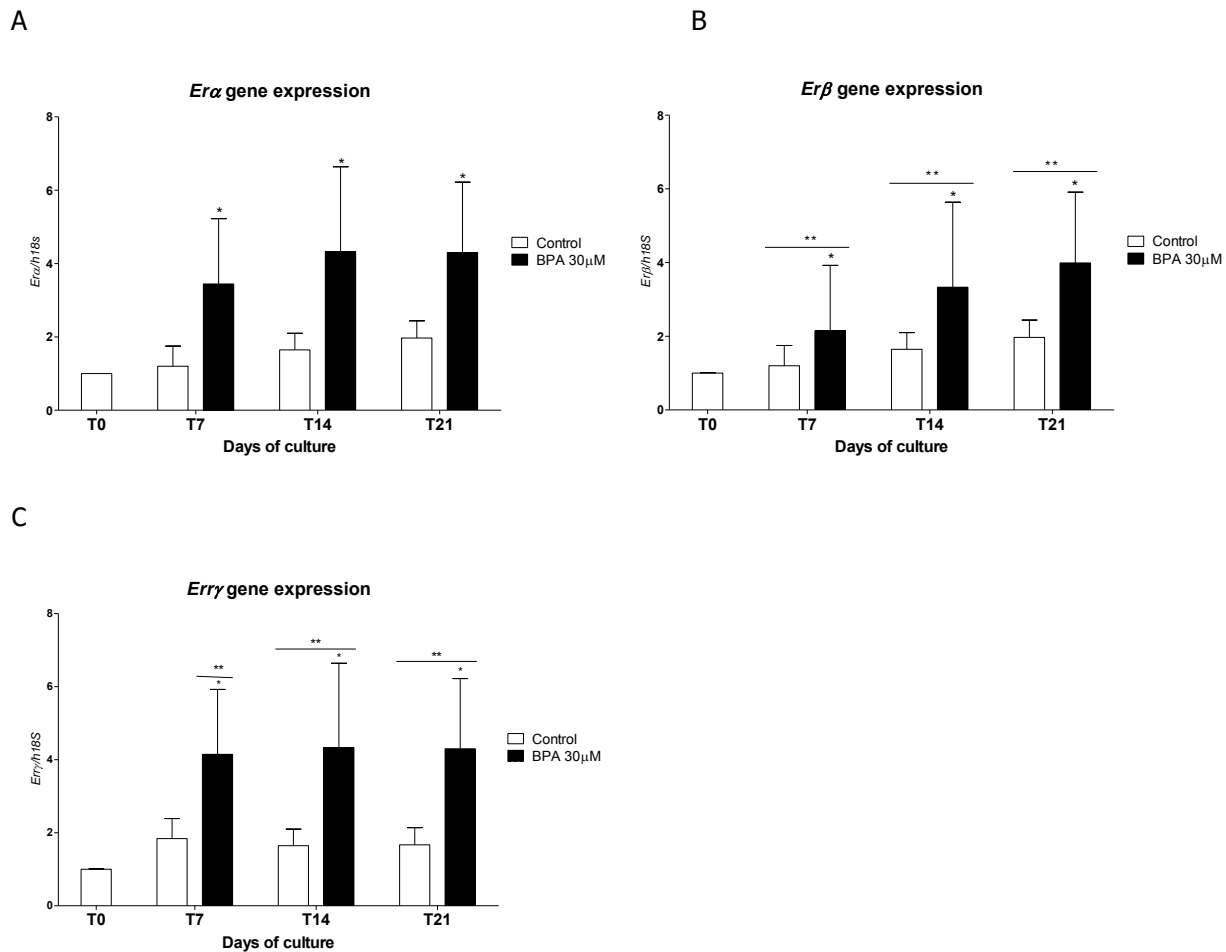
Figure 5. Expression of genes implied in DSB generation, signaling and repair in fibroblasts cultured with control-medium and BPA-supplemented medium.



\*\* Statistically different compared to un-cultured fibroblasts (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

\* Statistically different compared to control -medium (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

Figure 6. Gene expression of estrogen receptors in human fetal fibroblasts in oocytes cultured with control-medium and BPA-supplemented medium.



\*\* Statistically different compared to un-cultured fibroblasts (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )

\* Statistically different compared to control -medium (ANOVA Two-ways, Bonferroni post-test  $p \leq 0.05$ )



## 5. Discusión



### **5.1. DESARROLLO DE UN MODELO *IN VITRO* QUE PERMITE EL CULTIVO DE OVOCITOS FETALES HUMANOS.**

Durante décadas diversos grupos de investigación han intentado desarrollar técnicas de cultivo que permitan la progresión meiótica de los ovocitos fetales *in vitro* (Blandau, 1969; Zhang et al., 1995; Hartshorne et al., 1999; Lyrakou et al., 2002; Roig et al., 2006). Los resultados que se han obtenido hasta el momento, han implicado avances importantes en las metodologías necesarias para mantener y permitir la progresión meiótica de ovocitos fetales en cultivo pero de manera desafortunada los avances descritos por estos grupos no ha logrado que las células en cultivo mimeticen en un 100% los fenómenos que suceden *in vivo*. Los resultados de los protocolos que se han empleado en el cultivo de ovocitos y folículos provenientes de tejido ovárico fetal (ratón y humano) han mostrados resultados muy variables (Schwartz and Roy, 1998; Hartshorne et al., 1999; Lyrakou et al., 2002; Biron-Shental et al., 2004; Roig et al., 2006; Romero and Smitz, 2008; Sadeu and Smitz, 2008). La variabilidad de estos resultados ha consistido en la obtención/estudio de un número bajo de células, incremento en la muerte celular y tasas bajas de progresión meiótica. Estos resultados se han asociado a la gran bio-variabilidad que se ha descrito tanto entre ovocitos provenientes de un mismo ovario así como entre ovocitos provenientes de ovarios de diferentes individuos lo que ha dificultado aún más la estandarización de la técnica. En este sentido si no hay posibilidad de estandarizar una técnica tampoco habrá posibilidad de que los resultados obtenidos sean consistentes, robustos y reproducibles.

En este trabajo de tesis se han empleado 7,119 ovocitos con el fin de estandarizar la técnica de cultivo, hacerla consistente y robusta. Las características de la técnica que se ha empleado han permitido que los ovocitos en cultivo sigan las pautas descritas en ovocitos fetales en fresco (Roig et al., 2005). La posibilidad de reproducir las condiciones adecuadas para que los ovocitos progresen en cultivo se basa en la utilización de un método de disgregación adecuado, así como el uso de un medio de cultivo enriquecido. En este sentido, en este trabajo de tesis se han empleado 4 diferentes **métodos de disgregación**, los resultados obtenidos para cada uno de ellos, han indicado que los métodos de disgregación mecánica (punción y fragmentos ováricos) permiten un mejor resultado en cuanto a supervivencia y progresión meiótica. Aun cuando los resultados que se han obtenido mediante los métodos mecánicos superan los obtenidos con métodos enzimáticos, se ha observado la existencia de diferencias entre el método de punción y el de fragmentos ováricos.

La disgregación con la técnica de punción implica que se usen agujas entomológicas causando un daño agudo a la estructura celular así como a las vías de comunicación entre las diferentes células presentes en el ovario fetal. El daño agudo que se ha provocado por el proceso de disgregación se observa como un incremento en el número de ovocitos degenerados en etapas

tempranas del cultivo (T7). El incremento que se observa inicialmente en el porcentaje de ovocitos degenerados se compensa por una disminución en el número de ovocitos degenerados al final de cultivo (T21).

A diferencia de lo que se ha observado en el método de punción, en el método de fragmentos ováricos el número de ovocitos degenerados se incrementa en etapas tardías del cultivo (T21). Este fenómeno se puede asociar a la estructura de los fragmentos cultivados, en los cuales aquellos ovocitos que se encuentran en las capas más superficiales del fragmento pueden acceder a una mayor cantidad de nutrientes así como de oxígeno, mientras las capas más internas el aporte de nutrientes sería menor (Senbon et al., 2003). La reducción en la concentración de nutrientes que se presenta en los ovocitos de las capas más internas del bloque conlleva a un incremento en la degeneración celular. Es importante señalar que independientemente de las diferencias que se han observado entre ambos métodos mecánicos estas diferencias no han sido lo suficientemente grandes como para ser estadísticamente significativas por lo que para fines prácticos ambas técnicas han mostrado la misma eficiencia.

En cuanto a los métodos enzimáticos (colagenasa+hialuronidasa y tripsina) ambos métodos han mostrado un incremento en el número de ovocitos degenerados así como una disminución en el número de ovocitos en los diferentes tiempos de cultivo. Los resultados observados se han asociado al efecto de las enzimas sobre la membrana celular. En la membrana celular la actividad enzimática se ha asociado a alteraciones en la permeabilidad y fluidez de membrana. Dichas alteraciones se han explicado por el efecto nocivo que las enzimas tienen sobre las proteínas de membrana tanto de tipo estructural como aquellas que funcionan como receptores (Melican et al., 2004). La degradación enzimática de las proteínas conlleva a la pérdida de la estructura de las proteínas razón por la cual además de afectar la estructura de membrana alteran las respuestas celulares mediadas por receptores membranales proteicos (Melican et al., 2004). Finalmente, las enzimas también han sido asociadas a la generación de radicales libres mediante la activación de cadenas de estrés oxidativo, los radicales libres generados por estas cadenas de estrés oxidativo afectarían a los lípidos de membrana produciendo especies reactivas de oxígeno y derivados prostanoideos que perpetuarían el daño celular (Miyano, 2005).

Un punto importante tanto en los métodos mecánicos como en los enzimáticos es la preservación del microambiente. El microambiente se puede definir como todo el conjunto de condiciones tanto físicas como químicas que se encuentran en el entorno de las células. En este sentido, los métodos mecánicos han mostrado que la preservación del microambiente permite la progresión de células en cultivo. Es importante recordar que en el ovario fetal, fibroblastos, ovocitos, ovogonias y células de la granulosa están en contacto, y que cada uno de estos tipos celulares tiene la capacidad de producir factores de crecimiento, hormonas y factores peptídicos que actúan tanto en las células que la producen como en las células circundantes. Se ha observado

que el equilibrio entre las diferentes células y sus productos promueve la progresión, diferenciación y supervivencia de los ovocitos (Yamamoto et al., 1998; Senbon et al., 2003). Cuando las células son disgregadas mediante medios enzimáticos, la interacción entre todas ellas se pierde ya que cada una de las células se mantendrá aislada, por lo que factores de crecimiento producido por otro tipo de células y necesario para el desarrollo y progresión se encuentran ausentes.

En relación al **medio de cultivo**, es importante señalar que el uso de SCF permite que un mayor número de ovocitos progrese y alcance el sub-estadio de paquiteno en cultivo y que el número de ovocitos degenerados disminuya. El SCF es un factor de crecimiento que permite la activación de receptores de membrana del tipo tirosina quinasa que se ha relacionado a la activación de segundos mensajeros intracelulares que estimulan la actividad de ciclinas, factores anti-apoptóticos (Ras, Rac1 y Myc) y receptores nucleares (kitL) (Hoei-Hansen et al., 2007). La activación de estas diversas cascadas de respuestas intracelulares le confiere al SCF una actividad anti-apoptótica y pro-mitótica (Bedell and Mahakali, 2004; Hoyer et al., 2005; Carlsson et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis han demostrado que el SCF en los ovocitos fetales humanos en cultivo permite que un mayor número de ovocitos progrese a través de la profase meiótica. La respuesta que se ha observado en relación al enriquecimiento del medio de cultivo con SCF, es un incremento en la tasa de supervivencia de los ovocitos así como un incremento en la tasa de progresión meiótica independientemente del método de disgregación empleado. Esta respuesta nos sugiere que el SCF además de estimular la progresión meiótica pudiese funcionar como factor que estimule el rescate celular tal y como se ha observado en ovocitos disgregados con enzimas. El rescate celular se puede asociar a la neutralización de los fenómenos pro-apoptóticos mediados por la mitocondria así como a la inhibición de la actividad de las caspasas (Pesce et al., 1993; Zeuner et al., 2007).

Por otro lado, el SCF ha demostrado que puede inducir la mitosis de ovogonias tanto en ratón como en cerdo (Moniruzzaman et al., 2007; Moniruzzaman y Miyano, 2007), así como la promoción de la producción de factor 9 y proteína morfogénica 15 ambos implicados en la maduración de ovocitos provenientes de tejido ovárico de púberes y adultos (Thomas y Vanderhyden, 2006). Estas funciones descritas para el SCF, han permitido postular que el incremento en los ovocitos en cultivo también puede depender de la diferenciación de ovogonias a ovocitos. En este sentido, ovogonias presentes al inicio del cultivo tendrían la posibilidad no solo de dividirse mitóticamente sino también de diferenciarse a nuevos ovocitos incrementándose así la población. Esta teoría se puede fundamentar en los resultados obtenidos de la evaluación de la expresión génica. Los resultados obtenidos de la evaluación de la expresión génica descritos en este trabajo de tesis se puede observar como el gen STRA8 (Niikura et al., 2009, 2010; Jia et al., 2010; Dyce et al., 2011) que se ha relacionado con la progresión de ovogonia a ovocito, se sobre-

expresa conforme pasa el tiempo de cultivo hasta un pico máximo durante T14. Este pico máximo coincide con el inicio de la sobreexpresión del gen NALP5 asociado a la progresión de ovocito a folículo primordial y que alcanza su valor máximo durante T21 (Sanchez et al., 2009; Pisani et al., 2010).

Finalmente, es importante señalar que los mejores resultados son precisamente aquellos en los cuales se utilizó el método de disgregación adecuado en compañía de un medio de cultivo enriquecido correctamente. Los resultados que se han presentado en este trabajo de tesis ha mostrado que los ovocitos fetales humanos cultivados con medio de cultivo enriquecido con SCF y disgregados con métodos mecánicos presentan un mayor número de ovocitos que progresan a paquiteno y una disminución del número de ovocitos degenerados. Además del incremento que se ha descrito, una de las diferencias más importantes con respecto a los reportes previos (Schwartz and Roy, 1998; Hartshorne et al., 1999; Lyrakou et al., 2002; Biron-Shental et al., 2004; Roig et al., 2006; Romero and Smitz, 2008; Sadeu and Smitz, 2008) ha sido la homogeneidad de los resultados entre los diferentes casos empleados, tanto a nivel de progresión meiótica como de supervivencia. La homogeneidad de los resultados se ha basado en la reproducibilidad de las condiciones al realizar la selección de la muestra, el transporte y mantenimiento condiciones de cultivo en todos los casos. La fortaleza de los resultados se basa en esta estandarización, reproducibilidad y robustez.

Con respecto a la **recombinación meiótica** es importante señalar que ninguno de los estudios publicados previamente han reportado la posibilidad de evaluar la recombinación en modelos de cultivo, ya sea porque no se ha logrado observar o por que no fue analizada. En este sentido, los reportes previos en ratón (Lyrakou et al., 2002) concluyeron que los ovocitos eran incapaces de recombinar en cultivo. Estos investigadores emplearon en su cultivo SCF y LIF, ambos utilizados en el cultivo de células madre embrionarias. En el caso específico de LIF, este suplemento se ha utilizado en los cultivos con el objetivo de impedir la diferenciación de las células madre a otras estirpes celulares, dado que la meiosis es un proceso de diferenciación es posible que la suplementación con LIF impidiese su progresión y por tanto la recombinación. Por otro lado el uso de tripsina en el proceso de disgregación posterior al cultivo puede también estar relacionada con ausencia de MLH1 en estos ovocitos.

La técnica que se ha desarrollado en este trabajo, ha permitido que el proceso de recombinación se realice en ovocitos humanos en cultivo. Los resultados obtenidos muestran que el número de puntos de recombinación (*foci* de MLH1) encontrados tanto en T0 como en el resto de días de cultivo son similares a lo descrito en ovocitos no cultivados (Lenzi et al., 2005; Robles et al., 2009). La conservación del microambiente, la suplementación con SCF así como la correcta

selección de la muestra, sin duda han permitido que las células en cultivo sigan el proceso de diferenciación y que completen los procesos de apareamiento, sinapsis y recombinación.

Las condiciones empleadas tanto en la disgregación como en la elección de un medio de cultivo adecuado además de permitir que desde el punto de vista citogenético los ovocitos progresen adecuadamente en la profase I también han permitido que la expresión génica de las células cultivadas sea similar a la descrita en ovocitos no cultivados. En este sentido, la expresión génica en ovocitos fetales humanos al igual que la progresión meiótica, ha sido estudiada por un grupo muy reducido de investigadores. Solo existe un estudio en el cual se ha estudiado la **expresión génica en ovocitos fetales humanos** de genes implicados en la meiosis (Houmard et al. 2009) y uno en el que se ha valorado los genes implicados en meiosis en ratón (Lawson et al., 2011). Los autores han demostrado que el patrón de expresión de los genes es dependiente de las semanas de gestación.

En el caso de genes implicados en el apareamiento y sinapsis (*Sycp3*, *Stag3*, *Tex11* y *Tex14*) incrementan su expresión después de la semana número 12 de gestación y continúan elevados de manera constante hasta la semana 18, semana en la cual los autores terminan el estudio (Houmard et al., 2009). Se observa un patrón similar cuando se analiza la expresión génica en ratón, en esta especie previo a la entrada de los ovocitos en meiosis se eleva la expresión de *Smc1 $\beta$*  y posteriormente se mantiene estable (Lawson et al., 2011). También en ratón, *Sycp1* y *Mlh1* elevan su expresión con la entrada de ovocitos en meiosis y posteriormente se mantienen constantes (Lawson et al., 2011). Es importante señalar que el gen *Spo11*, relacionado con la generación de rupturas de doble cadena incrementa su expresión a las 12 semanas y sus valores se mantienen constantes (Houmard et al., 2009). Por otro lado, la expresión del gen *Nalp5* implicado en el proceso de progresión de ovocito a folículo primordial, ha mostrado que a partir de la semana 18 de gestación incrementa su expresión en coincidencia con la disminución de la expresión de *Stra8* (Fowler et al., 2009).

En este sentido los resultados obtenidos en este trabajo de tesis están en concordancia con lo descrito por Houmard et al., (2009) y Fowler et al., (2009). Los ovocitos fetales humanos cultivados con el modelo desarrollado asemejan lo descrito en ovocitos fetales no cultivados tanto en genes implicados en meiosis (*Sycp1*, *Spo11*, *Smc1 $\beta$* , *Mlh1* y *Rpa*) como con aquellos genes marcadores de la entrada del ovocito a meiosis (*Stra8*) como de progresión a folículo primario (*Nalp5*) (Baillet et al., 2008). Lo que permite indicar que el modelo de cultivo mimetiza tanto a nivel citogenético como a nivel de expresión génica lo descrito en ovocitos fetales humanos no cultivados.

Es importante señalar que aun cuando el perfil génico es similar a lo descrito en ovocitos no cultivados, las edades gestacionales de los ovarios cultivados varía de las 18 a las 21 semanas

de gestación. En este sentido dichas edades serían mayores que las descritas por Houmard et al., (2009). El hecho de poder observar un incremento en la expresión de genes marcadores del inicio de la meiosis (*Stra8*) y de diferenciación de ovocito a folículo primordial (*Nalp5*) podrían estar indicando la validez de la idea que se ha planteado previamente en relación a la posible la diferenciación de ovocitos a partir de ovogonias *in vitro* y posteriormente a folículos primarios.

## 5.2. EFECTOS DE BPA EN OVOCITOS FETALES HUMANOS EN CULTIVO.

Los resultados que se han obtenido en este trabajo de tesis muestran el efecto del BPA sobre los procesos de supervivencia, apareamiento, sinapsis, recombinación y expresión génica en ovocitos fetales humanos en cultivo.

En la actualidad existe un gran debate acerca de los efectos del BPA en el ser humano, de manera específica tanto en la mujer embarazada como en el feto y el recién nacido. Las agencias de protección del medio ambiente tanto en Estados Unidos de Norte América como en Europa han establecido límites de consumo máximo de BPA al día. Dichos límites se ha basado en estudios en animales de investigación y reportes epidemiológicos (revisión de Vanderberg et al., 2007; 2009; 2010) en los cuales, se han realizado múltiples estudios en relación a las concentraciones de BPA en plasma y en tejidos humanos (revisión de Vanderberg et al., 2007; 2009; 2010), las concentraciones reales en los órganos de los humanos siguen sin conocerse. La mayor discusión probablemente se ha centrado en los resultados obtenidos *in vitro*, debido a que los defensores del BPA, han indicado que las dosis aplicadas superan en mucho las concentraciones circulantes en humano. Las concentraciones que se han aplicado para la realización de este trabajo de tesis se encuentran de acuerdo con las concentraciones empleadas en la evaluación de procesos meióticos tanto en ratones como en *C. elegans* (Hunt et al., 2003; Susiarjo et al., 2007; Allan y Colaiácovo, 2010), así como con los valores reportados en exposición laboral (Goubing et al., 2001). En este sentido las dosis así como los resultados que se han obtenido asemejan a los que han sido descritos en ambos organismos.

Los ovocitos fetales humanos cultivados con BPA y E<sub>2</sub> presentan un **incremento en el número de ovocitos degenerados**, este incremento ha sido independiente del tiempo de cultivo y de la dosis administrada. Lo que puede indicar que al menos a las concentraciones que han sido aplicadas en este trabajo no existe un umbral en el cual BPA induciría la degeneración del ovocito y si existe, la dosis umbral se encuentra por debajo de las concentraciones aplicadas. La importancia de estas observaciones radica en la capacidad del modelo de cultivo de poder discriminar los efectos de diferentes sustancias. En este sentido, este efecto discriminatorio se puede observar en los ovocitos cultivados con el vehículo (DMSO), los cuales no han mostrado un incremento en las células degeneradas mientras que aquellos cultivados BPA y E<sub>2</sub> sí lo presentan.



Por otro lado, estos resultados implican que tanto el BPA como  $E_2$  estimulan mecanismos que llevan al ovocito a la degeneración. Los mecanismos que probablemente se encuentren implicados se hallarían en la capacidad del BPA para inducir señales intracelulares de tipo pro-apoptótico así como señales que causen arresto celular y activación de caspasas (Raychoudhury et al., 1999; Xu et al., 2002; Richter et al., 2007; Bontempo et al., 2009). Los resultados parecidos entre ambos compuestos hacen presuponer que la vía que se implica en el proceso de degeneración de los ovocitos se relacione con la actividad de receptores estrogénicos. Sin embargo es posible que ambas sustancias produzcan el mismo efecto sin utilizar las mismas vías.

Los ovocitos fetales humanos cultivados con medio de cultivo suplementado con BPA muestran un **retraso en la progresión meiótica**. El retraso en la progresión meiótica se ha caracterizado por la variación en los porcentajes de ovocitos encontrados en cada uno de los sub-estadios de la profase meiótica con respecto a los observados en controles. En este sentido, los ovocitos cultivados con BPA han mostrado un incremento en el porcentaje de ovocitos en leptoteno y este incremento, fue proporcional a los días de cultivo y a la concentración de BPA a la que fueron expuestos. Es decir, a mayor concentración y más días de cultivo un mayor porcentaje de ovocitos en leptoteno. Esta observación se puede relacionar por un lado a la posible diferenciación de ovogonias a ovocitos debido al efecto pro-mitótico y anti-apoptótico del SCF (Abir et al., 2004; Moniruzzaman et al., 2007). Si un mayor número de ovogonias se divide y progresa a ovocito habrá un porcentaje mayor de ovocitos en las diferentes sub-estadios de la profase. En este sentido, el aumento se podría observar en todas las etapas, pero es importante señalar que en el caso de los ovocitos expuestos a BPA se observa que el mayor incremento se encuentra únicamente en leptoteno. Es importante señalar, que aun cuando el porcentaje de ovocitos en leptoteno se ha incrementado en los ovocitos expuestos a BPA, los porcentajes de ovocitos en zigoteno tanto en los controles como en los expuestos a BPA no han presentado diferencias.

Estudios previos (Can et al., 2005; Richter et al., 2007), han demostrado que el BPA puede causar retrasos en el ciclo celular y estas alteraciones se han asociado a fallos en la síntesis, actividad y estructura de elementos propios del cito-esqueleto y microtúbulos. De este modo, si existe un mayor número de ovocitos que inician la meiosis pero a su vez son incapaces de tener una progresión meiótica adecuada, se podrá observar una acumulación de ovocitos en las primeras etapas de la profase. Esta idea ha sido demostrada en los estudios de Allan y Colaiácovo (2010), en los cuales se han observado un incremento en la muerte celular después de la exposición al BPA, así como un incremento en el porcentaje de ovocitos en leptoteno.

Con respecto a los ovocitos en paquitenio se ha observado que el porcentaje de ovocitos expuestos a BPA disminuyó de manera estadísticamente significativa respecto a los controles.

Estudios previos en ratón y en *C. elegans* han demostrado que ovocitos expuestos a BPA presentan un mayor porcentaje de anomalías en el proceso de apareamiento y sinapsis. En este sentido, un incremento en estas alteraciones estaría relacionado a un bloqueo en la progresión meiótica (Susiarjo et al., 2007; Allan and Colaiácovo, 2010). Es importante señalar que la caída que se ha observado en los porcentajes de ovocitos en paquiteno, fue proporcional al incremento en ovocitos degenerados. Esta relación se podría asociar a que un ovocito que presente alteraciones graves en apareamiento y sinapsis, sería eliminado y no alcanzaría el sub-estadio de paquiteno. Actualmente se acepta que el punto de control de la profase para la eliminación de ovocitos defectuosos se encuentra posterior al paquiteno a diferencia de lo observado en los ovocitos en cultivo. Esta diferencia, se podría asociar a la manipulación de los ovocitos antes y durante el cultivo lo que conllevaría al aumento en la degeneración de celular y la disminución de los paquitenos. Por otro lado, los resultados obtenidos con la expresión genes implicados en la cohesión entre cromátides hermanas (*Smc1 $\beta$* ) así como en la sinapsis (*Sycp1*), indican que el BPA no afecta la expresión de estos genes, ya que sus niveles de expresión se mantienen con respecto a los valores observados en los controles en cultivo. Estos datos podrían implicar que los defectos observados en relación al apareamiento y sinapsis (Susiarjo et al., 2007; Allan y Colaiácovo, 2010) podrían estar relacionados a fallos en el citoesqueleto que impediría el total apareamiento cromosómico así como a posibles fallos en los procesos de síntesis de las proteínas o deficiencias en su maduración post-transcripción. La dilucidación de estas posibilidades podría ser realizada mediante técnicas de *western-blot*, que en este estudio no han sido realizadas.

Al mismo tiempo, los resultados obtenidos demuestran que el BPA incrementa la expresión génica de genes implicados en la generación de rupturas de doble cadena (*Spo11*), señalización de las rupturas (*H2ax*) así como en los de reparación de las rupturas (*Rpa* y *Blm*). En este sentido se ha observado que todas ellas han presentado una regulación positiva, desde 0.5 veces más expresión en el caso de *Spo11* en T7 hasta un incremento de casi 150 veces en el caso de *Rpa* en T21. Estos datos indican que el BPA pudiese estar estimulando la generación de rupturas de doble cadena mediante la regulación positiva de *Spo11* y que la generación de estas rupturas desencadenaría la regulación positiva de los genes de detección y reparación.

Así pues y de manera global, se puede decir que el BPA afecta la progresión meiótica incrementando los porcentajes de ovocitos en leptoteno y reduciendo el porcentaje de ovocitos que alcanzan el paquiteno aun cuando no modifica la expresión de genes implicados en la cohesión entre cromátides hermanas y sinapsis. Es decir, el BPA enlentece la progresión meiótica aunque no la impide.

En relación a la **recombinación meiótica**, los resultados que se han obtenido en este trabajo de tesis demuestran que los ovocitos fetales humanos en cultivo expuestos a BPA presentan un incremento en la recombinación meiótica. Los ovocitos expuestos a BPA presentaron un incremento en número de *foci* de MLH1 y este incremento se observó en relación a la concentración de BPA a la cual fueron expuestos. Los ovocitos que han sido cultivados con concentraciones de BPA 10 $\mu$ M o mayores, presentaron un incremento en el número de *foci* de MLH1 independientemente de los días de cultivo. Estas observaciones podrían indicar que el efecto causado por BPA sobre el proceso de recombinación de los ovocitos fetales humanos es dependiente de la concentración con un valor umbral de 10 $\mu$ M e independiente del tiempo de exposición. En el caso de estradiol se ha observado que el incremento en la recombinación es dependiente del tiempo de exposición más que de la concentración aplicada ya que la misma concentración produce respuestas diferentes en tanto en T14 como en T21. Este tipo de respuesta es lo que en inglés se denomina como *dose-response-time-fashion-like activity*.

Los estudios previos realizados en ratones han mostrado como el BPA causa un incremento en el número de *foci* de MLH1 (Susiarjo et al., 2007). En estos estudios también se ha demostrado que animales en los cuales mediante técnicas de biología molecular se impide la expresión y actividad de ER $\beta$  presentan características similares a las que se han observado en animales tratados con BPA. En este sentido, los autores han concluido que el efecto del BPA en ovocitos de ratón se relaciona a un efecto antagónico del BPA sobre ER $\beta$ . Los resultados que se han observado en ratón también se han visto en *C. elegans*. En este organismo se ha descrito que la administración conjunta de estradiol y BPA puede permitir el rescate de los ovocitos afectados por el BPA (Allan and Colaiácovo, 2010). A diferencia de los resultados que han sido descritos por estos investigadores, en este trabajo se ha observado que tanto BPA como E<sub>2</sub> pueden inducir un incremento en el número de *foci* de MLH1, lo que se contrapondría a la teoría de que el efecto del BPA es mediado únicamente por su efecto antagónico sobre ER $\beta$ . En este sentido, es importante señalar que aun cuando ambos compuestos producen un efecto similar, los resultados observados no son idénticos. Los ovocitos tratados con BPA han presentado un incremento mayor en el número de *foci* de MLH1 desde el inicio del cultivo mientras que, los tratados con estradiol no.

Como se ha mencionado previamente, los genes implicados en la generación, señalización y reparación de las rupturas de doble cadena se encuentran regulados de manera positiva por el BPA. La excepción es el gen de *Mlh1*, en el cual a diferencia de *Rpa* y *Blm*, se observa una regulación negativa con respecto a los valores observados en los ovocitos no cultivados. La regulación negativa inicialmente observada se recupera paulatinamente hasta regresar a los valores basales a los 21 días de cultivo. Los resultados obtenidos tanto en ovocitos humanos no cultivados como en ovocitos de ratón expuestos y no expuestos (Fowler et al., 2009; Hourmand et al., 2009; Lawson et al., 2011) han mostrado que la expresión de *Mlh1* no se modifica. Los resultados descritos por

estos autores así como los observados en este trabajo de tesis son diferentes a los que se han obtenido en el estudio citogenético en los cuales los *foci* de MLH1 se incrementan cuando el ovocito se expone al BPA. En este sentido se postula, que probablemente la célula sintetice una gran cantidad de proteína MLH1 de manera previa a la generación de las rupturas de doble cadena. De este modo, la proteína podría estar almacenada en un reservorio celular en el cual permanecería hasta que se desencadenasen las señales celulares para su liberación y utilización.

Finalmente no se puede descartar que el efecto que se ha observado en relación al incremento en la recombinación meiótica dependa de un efecto directo de los compuestos sobre el ADN. Estudios previos, han mostrado que tanto BPA como E<sub>2</sub> pueden generar aductos a nivel de ADN, los cuales tendrán que ser reparados por la célula (Yang et al., 2006). En este sentido, estudios realizados en líneas celulares de cáncer de mama y linfoma muestran como ambos compuestos incrementan la formación de rupturas de doble cadena así como un incremento a nivel citológico de BLM y H2AX (Iso et al., 2006; 2006), por lo que la teoría de que el efecto del BPA en ovocitos es únicamente dependiente de su actividad antagónica sobre ERβ (Susiarjo et al., 2007; Allan and Colaiácovo, 2010) podría no ser exacta del todo.

Tal y como se ha mencionado previamente, existen diferencias en cuanto al efecto observado del BPA si se compara con E<sub>2</sub>, por lo que es importante mencionar que si el efecto del BPA es como antagonista de ERβ, **¿Por qué el estradiol causa un efecto similar?** Los posibles mecanismos implicados se han enfocado a diferentes niveles. Por un lado, se postula que el efecto esté mediado por una pérdida en el equilibrio de la actividad de los receptores estrogénicos. Durante el desarrollo fetal, los ERβ se encuentran presentes en el ovario fetal antes de la semana 20 de gestación mientras que los ERα solo se observan después de la semana número 20 (Vaskivuo et al., 2005). En condiciones fisiológicas el estradiol en el ovario se une preferentemente a ERβ, y por tanto en general los efectos estrogénicos en el ovario son dependientes del ERβ. Cuando en el ovario se bloquea la actividad de ERβ, es posible que la actividad de ERα se pueda observar más fácilmente. Cuando se administran dosis elevadas de estradiol se podrían activar ambos receptores y observar la respuesta celular de ambos. Cuando el producto que se administra es BPA, este bloqueará la actividad de ERβ y será observable la de ERα. Por otro lado, se podría explicar la respuesta observada con estradiol a la activación de ERRs. Se considera que BPA puede activar esta subfamilia de receptores, en específico el de tipo γ, y aun cuando existe controversia acerca de la posible activación por estradiol, ésta podría ser una posible ruta celular seguida por ambos compuestos para causar el efecto observado (Greschik et al., 2002; Huppunen et al., 2004; Alonso et al., 2006).

Finalmente, es importante señalar que ninguna de estos posibles mecanismos de acción propuestos se puede descartar ya que los resultados obtenidos de la evaluación de la expresión de los genes de receptores estrogénicos indican que el BPA regula de manera positiva todos los tipos de receptores (ER $\alpha$ , ER $\beta$  y ERR $\gamma$ ). Se han descrito diferentes estudios en relación a la actividad antagónica del BPA sobre los receptores  $\beta$  (Hiroi et al., 1999; Takayanagi et al., 2006; Wetherill et al., 2007), por lo que la regulación positiva que se ha observado puede deberse a un mecanismo de contra-regulación, es decir la célula induciría la síntesis de nuevos receptores para compensar el déficit provocado por la actividad del BPA. Sin duda, se deberán realizar más estudios para establecer el balance entre los diferentes receptores en relación a su estimulación por BPA.

### **5.3. POSIBLES IMPLICACIONES DE LOS EFECTOS DEL BPA A LARGO PLAZO.**

Sin duda lo más importante de todos los datos que se han obtenido es el posible efecto a largo plazo de BPA en la reproducción humana. La importancia de estas observaciones radica en que el efecto sobre los ovocitos fetales no se puede observar al nacimiento. Los efectos solo podrán ser observados durante la vida reproductiva de la hija de la madre expuesta y en los nietos de ésta. Es decir los efectos serán transgeneracionales, ya que como se ha observado los ovocitos expuestos a BPA incrementan el riesgo de anomalías numéricas debidas a fallos en la disyunción posiblemente asociados al incremento en la recombinación meiótica (Susiarjo et al., 2007; Allan y Colaiácovo, 2010), con lo que el riesgo de trisomías y monosomías en los nietos de la mujer expuesta se incrementarían. Por otro lado, el aumento en la degeneración de ovocitos durante la vida fetal, elevaría las posibilidades de insuficiencia ovárica temprana e infertilidad en la hija de la madre expuesta.

Finalmente, es importante señalar, que los efectos génicos observados a nivel de ovocitos y tejido conectivo fetal pueden presentarse en otros órganos fetales. Las alteraciones en otros órganos y estirpes celulares pueden conllevar a un incremento en fragilidad cromosómica, mayor susceptibilidad a hormonas esteroideas y riesgos de cáncer.

#### **5.4.1. VENTAJAS DEL MODELO DE CULTIVO.**

El modelo que se ha desarrollado en este trabajo de tesis cuenta con una serie de ventajas o virtudes. Los factores positivos o beneficios del modelo se describen a continuación:

- Es el primer método de cultivo que se ha descrito para ovocitos fetales humanos. En la actualidad, es el único modelo que permite reproducir en cultivo los eventos más representativos que suceden durante la profase I (apareamiento, sinapsis y recombinación).

- Es un modelo que permite la evaluación del perfil de expresión génica de los ovocitos fetales humanos. Los resultados obtenidos indican que el patrón de expresión génica en cultivo no se modifica con respecto a lo observado en ovocitos en fresco.
- Es un modelo estandarizado, reproducible y robusto. Los resultados obtenidos se mantienen constantes independientemente del caso analizado y tiempo de cultivo. Las diferentes técnicas de disgregación mecánicas y los suplementos empleados muestran resultados similares en todos los tiempos de cultivo independientemente de la muestra.
- Es un modelo que permite la evaluación de diferentes sustancias químicas. Los resultados obtenidos de los cultivos expuestos a DMSO, BPA y E<sub>2</sub>, indican que el modelo tiene la capacidad de discriminar el efecto de diferentes sustancias.
- Es un modelo que permite establecer umbrales de exposición. Los resultados obtenidos de los cultivos expuestos a BPA y E<sub>2</sub> indican que el modelo tiene la capacidad de distinguir umbrales con respecto a las concentraciones empleadas
- Es un modelo que permite establecer el efecto de una sustancia en relación al tiempo de exposición y a la concentración aplicada. Los resultados obtenidos de los cultivos expuestos a E<sub>2</sub> indican que el modelo tiene la capacidad de evaluar como una misma concentración tiene efectos diferentes a lo largo del tiempo de cultivo.
- Es un modelo que permite establecer viabilidad celular después de la exposición a sustancias. Los resultados en relación al número de ovocitos degenerados permite evaluar la supervivencia celular a diferentes concentraciones de una misma sustancia.
- El modelo permite la evaluación de la expresión génica ante la exposición a una sustancia. Los resultados obtenidos en relación a la expresión génica permiten distinguir como una sustancia puede producir diferentes efectos génicos en relación al gen estudiado. Por ejemplo el BPA regula de manera positiva la expresión de *Rpa*.
- Permite la sustitución de animales de experimentación y un conocimiento más cercano a lo que sucede *in vivo* en el humano.

#### **5.4.2. DESVENTAJAS DEL MODELO.**

Aun cuando es el único modelo existente que permite la evaluación de la profase meiótica en humanos, el modelo no es perfecto y por tanto implica una serie de desventajas que se mencionan a continuación:

- Es un modelo de cultivo dependiente de la obtención de la muestra. La obtención de ovarios fetales para cultivo de ovocitos en un proceso complicado y que no solo depende de investigador. Requiere de un Sistema Nacional de Salud bien desarrollado ya que es necesario establecer correctos protocolos de comunicación con los centros que donan el material biológico para poder seguir los pasos necesarios para que el cultivo sea posible.
- Es un modelo que utiliza material biológico humano, por lo que su uso se limita a zonas geográficas donde la legislación permita la existencia de bancos de tejidos fetales que suministren las muestras de tejido necesarias para el cultivo.
- El modelo aun cuando es estandarizado, robusto y reproducible depende en gran parte de la manipulación del personal que cultiva. Aun cuando el proceso es relativamente fácil en cuanto a la metodología establecida para la realización del cultivo es necesario la formación de personal para la realización de la técnica.
- Es un modelo que necesita de 3 semanas de cultivo y al menos 3 más para su análisis. Debido a que el proceso de progresión meiótica es un proceso lento y que las técnicas de evaluación mediante IF, FISH y expresión génica requieren personal altamente calificado el proceso de cultivo y evaluación implica al menos dos meses tomando en cuenta la posibilidad de obtener muestra de manera continuada.
- Es un modelo de cultivo caro. Los costos de los reactivos y equipos necesarios para la realización del cultivo son altos. Además de los costos de material fungible es necesario contar con personal altamente calificado para la realización de la técnica tanto.





## 6. Conclusiones



## 6. CONCLUSIONES.

1. El cultivo de ovocitos fetales humanos mediante el uso de métodos de disgregación mecánicos y medio de cultivo enriquecido con factor de crecimiento de células madre, permiten la progresión meiótica de manera sistemática y reproducible. Los ovocitos cultivados bajo estas condiciones tienen tasas menores de degeneración así como mayores porcentajes de ovocitos que alcanzan paquiteno. La recombinación meiótica solo se observa en los ovocitos disgregados con métodos mecánicos y cultivados con medio enriquecido con factor de crecimiento de células madre.
2. Los métodos de disgregación enzimática disminuyen la progresión meiótica de los ovocitos fetales humanos en cultivo e incrementan el número de ovocitos degenerados en todos los tiempos de cultivo. Los ovocitos que se han disgregado con métodos enzimáticos no presentan recombinación meiótica en cultivo.
3. El factor de crecimiento de células madre incrementa la progresión meiótica de los ovocitos fetales en cultivo independientemente del método de disgregación empleado para su cultivo. El factor de crecimiento de células madre disminuye el número de ovocitos que degeneran en cultivo y tiene un efecto de rescate en los ovocitos que se han disgregado con métodos enzimáticos.
4. El BPA y el  $E_2$ , disminuyen la viabilidad de los ovocitos fetales en cultivo e incrementan la recombinación meiótica. La disminución en la viabilidad de los ovocitos no depende de la dosis ni del tiempo de exposición en el caso de los ovocitos cultivados con BPA. El BPA presenta un umbral de actividad a partir del cual se observa un incremento en la recombinación meiótica en ovocitos fetales cultivados ( $10\mu\text{M}$ ). Los ovocitos fetales expuestos a  $E_2$  durante su cultivo, no presentan un umbral en relación a la disminución de la viabilidad. En el caso de la recombinación meiótica el efecto observado se asocia a un efecto de dosis respuesta, dependiente del tiempo de exposición y concentración a la que fueron expuestos los ovocitos. De manera particular se observó que el número de puntos de recombinación en el cromosoma 21 se duplicó en los ovocitos expuestos a BPA.
5. Los ovocitos fetales humanos en cultivo presentan un patrón de expresión génica que asemeja lo descrito en ovocitos fetales no cultivados en relación a los genes implicados en la cohesión (*Smc1 $\beta$* ), sinapsis (*Sycp1*), así como la generación (*Spo11*), señalización (*Rpa* y *H2ax*) y reparación (*Blm* y *Mlh1*) de las rupturas de doble cadena. Los ovocitos fetales cultivados presentan un patrón de expresión génica de los receptores de estrógenos (*Era*, *Er $\beta$*  y *Err $\gamma$* ) similar al descrito en ovocitos no cultivados.
6. Los ovocitos fetales humanos en cultivo presentan un patrón de expresión génica que se asemeja a lo descrito para ovocitos fetales humanos no cultivados en relación al gen implicado en la entrada del ovocito a la meiosis (*Stra $\delta$* ), así como en el gen implicado en la progresión de ovocito a folículo primordial (*Nalp5*).
7. El BPA regula de manera positiva y estadísticamente significativa la expresión de los genes implicados en la generación (*Spo11*), señalización y reparación (*Rpa* y *H2ax*) de rupturas de doble cadena en ovocitos fetales humanos. La expresión de *Mlh1* no se encuentra regulada de manera positiva en los ovocitos expuestos a BPA.

8. El BPA regula de manera positiva la expresión génica de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  y ER $\gamma$ . La sobreexpresión de los receptores es estadísticamente significativa en los ovocitos fetales humanos expuestos a BPA.

## 7. Bibliografía



**A**

- Abir, R., B. Fisch, et al. (2004). "Expression of stem cell factor and its receptor in human fetal and adult ovaries." *Fertil Steril* 82 Suppl 3: 1235-43.
- Adriani, W., D. D. Seta, et al. (2003). "Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior, and response to D-amphetamine in rats perinatally exposed to bisphenol A." *Environ Health Perspect* 111(4): 395-401.
- Akingbemi, B. T., C. M. Sottas, et al. (2004). "Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells." *Endocrinology* 145(2): 592-603.
- Alexander, A., S. L. Cai, et al. "ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9): 4153-8.
- Alonso, A., R. Fernandez, et al. (2006). "Regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in pregnant and estradiol treated rats." *Steroids* 71(13-14): 1052-61.
- Allard, P. and M. P. Colaiacovo (2010) "Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(47): 20405-10.
- Allard, P. and M. P. Colaiacovo (2011) "Mechanistic insights into the action of Bisphenol A on the germline using *C. elegans*." *Cell Cycle* 10(2): 183-4.
- Anderson, L. K., H. H. Offenberg, et al. (1997). "RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 6868-73.
- Aristei, C., P. Latini, et al. (2001). "Total body irradiation-based regimen in the conditioning of patients submitted to haploidentical stem cell transplantation." *Radiother Oncol* 58(3): 247-9.
- Artico, M., E. Bronzetti, et al. (2007). "Immunohistochemical profile of some neurotransmitters and neurotrophins in the seminiferous tubules of rats treated by lisdamine." *Eur J Histochem* 51(1): 19-24.
- Arturo Anadón, Mona-Lise Binderup, et al. (2010). "EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) EFSA Journal 2010; 8(9):1829 [116 pp.].
- Avissar-Whiting, M., K. R. Veiga, et al. (2010) "Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells." *Reprod Toxicol* 29(4): 401-6.
- Baker, T. G. (1963). "A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 158: 417-33.
- Balakrishnan, B., K. Henare, et al. (2010) "Transfer of bisphenol A across the human placenta." *Am J Obstet Gynecol* 202(4): 393 e1-7.
- Bannister, L. A. and J. C. Schimenti (2004). "Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis." *Cytogenet Genome Res* 107(3-4): 191-200.
- Barlow, A. L., F. E. Benson, et al. (1997). "Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes." *EMBO J* 16(17): 5207-15.
- Barlow, A. L. and M. A. Hulten (1998). "Crossing over analysis at pachytene in man." *Eur J Hum Genet* 6(4): 350-8.
- Bedell, M. A. and A. Mahakali Zama (2004). "Genetic analysis of Kit ligand functions during mouse spermatogenesis." *J Androl* 25(2): 188-99.
- Belfroid, A., M. van Velzen, et al. (2002). "Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements." *Chemosphere* 49(1): 97-103.
- Biles, J. E., K. D. White, et al. (1999). "Determination of the diglycidyl ether of bisphenol A and its derivatives in canned foods." *J Agric Food Chem* 47(5): 1965-9.
- Blandau, R. J. (1969). "Observations on living oogonia and oocytes from human embryonic and fetal ovaries." *Am J Obstet Gynecol* 104(3): 310-9.
- Bojko, M. (1988). "Presence of abnormal synaptonemal complexes in heterothallic species of *Neurospora*." *Genome* 30(5): 697-709.
- Bojko, M. (1989). "Two kinds of "recombination nodules" in *Neurospora crassa*." *Genome* 32(2): 309-17.
- Bojko, M. (1990). "Synaptic adjustment of inversion loops in *Neurospora crassa*." *Genetics* 124(3): 593-8.
- Bolt, H. M., P. Janning, et al. (2001). "Comparative assessment of endocrine modulators with oestrogenic activity: I. Definition of a hygiene-based margin of safety (HBMOS) for xeno-oestrogens against the background of European developments." *Arch Toxicol* 74(11): 649-62.
- Bontempo, P., L. Mita, et al. (2009). "Molecular analysis of the apoptotic effects of BPA in acute myeloid leukemia cells." *J Transl Med* 7: 48.
- Bouskine, A., M. Nebout, et al. (2009). "Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor." *Environ Health Perspect* 117(7): 1053-8.
- Brede, C., P. Fjeldal, et al. (2003). "Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing." *Food Addit Contam* 20(7): 684-9.
- Brotons, J. A., M. F. Olea-Serrano, et al. (1995). "Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans." *Environ Health Perspect* 103(6): 608-12.
- Budavari, Z., Z. Porkolab, et al. (2004). "Study of triethyl citrate migration from coating polymers to tablet cores." *Pharmazie* 59(11): 893-4.
- Burke, B. (1990). "On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes." *Exp Cell Res* 186(1): 169-76.
- Burke, D. J. (2000). "Complexity in the spindle checkpoint." *Curr Opin Genet Dev* 10(1): 26-31.
- Byskov, A. G., M. J. Faddy, et al. (2005). "Eggs forever?" *Differentiation* 73(9-10): 438-46.

**C**

- Cabero, L. and E. Suarez (2007). *Obstetricia y Medicina Materno-Fetal*. 145-49.

- Cagen, S. Z., J. M. Waechter, Jr., et al. (1999). "Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A." *Toxicol Sci* 50(1): 36-44.
- Cagen, S. Z., J. M. Waechter, Jr., et al. (1999). "Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water." *Regul Toxicol Pharmacol* 30(2 Pt 1): 130-9.
- Calafat, A. M., X. Ye, et al. (2008). "Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004." *Environ Health Perspect* 116(1): 39-44.
- Calvani, M., F. Aiuti, et al. (1979). "[Regular trisomy 21 and combined immunodeficiency. Ineffectiveness of thymosin]." *Minerva Pediatr* 31(23): 1691-7.
- Campbell, B. K., B. M. Gordon, et al. (1994). "The effect of ovarian arterial infusion of transforming growth factor alpha on ovarian follicle populations and ovarian hormone secretion in ewes with an autotransplanted ovary." *J Endocrinol* 143(1): 13-24.
- Can, A., O. Semiz, et al. (2005). "Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis." *Mol Hum Reprod* 11(6): 389-96.
- Carolan, C., P. Monaghan, et al. (1994). "Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro." *Theriogenology* 41(5): 1061-8.
- Celeste, A., S. Petersen, et al. (2002). "Genomic instability in mice lacking histone H2AX." *Science* 296(5569): 922-7.
- Codina-Pascual, M., M. Oliver-Bonet, et al. (2005). "Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator." *Hum Reprod* 20(8): 2133-9.
- Cooper, R. J., T. J. Klopfenstein, et al. (1999). "Effects of imposed feed intake variation on acidosis and performance of finishing steers." *J Anim Sci* 77(5): 1093-9.
- Couse, J. F., S. Curtis Hewitt, et al. (2000). "Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues." *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5): 287-96.
- Couse, J. F., S. C. Hewitt, et al. (1999). "Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta." *Science* 286(5448): 2328-31.
- Couse, J. F., M. M. Yates, et al. (2003). "Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta." *Mol Endocrinol* 17(6): 1039-53.
- Champion, M. D. and R. S. Hawley (2002). "Playing for half the deck: the molecular biology of meiosis." *Nat Cell Biol* 4 Suppl: s50-6.
- Chapin, R. E., J. Adams, et al. (2008). "NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A." *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 83(3): 157-395.
- Chauvigne, F., A. Menuet, et al. (2009). "Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro." *Environ Health Perspect* 117(4): 515-21.
- Chen, X., C. Wang, et al. (2011). "Determination of bisphenol A in water via inhibition of silver nanoparticles-enhanced chemiluminescence." *Anal Chim Acta* 689(1): 92-6.
- Cheng, E. Y., Y. J. Chen, et al. (1995). "Chromosome painting analysis of early oogenesis in human trisomy 18." *Cytogenet Cell Genet* 70(3-4): 205-10.
- Cheng, Y. E. and S. M. Gartler (1994). "A fluorescent in situ hybridization analysis of X chromosome pairing in early human female meiosis." *Hum Genet* 94(4): 389-94.
- Chitra, K. C., C. Latchoumycandane, et al. (2003). "Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats." *Toxicology* 185(1-2): 119-27.
- Chitra, K. C., K. R. Rao, et al. (2003). "Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study." *Asian J Androl* 5(3): 203-8.
- ## D
- D'Antuono, A., V. C. Dall'Orto, et al. (2001). "Determination of bisphenol A in food-simulating liquids using LCED with a chemically modified electrode." *J Agric Food Chem* 49(3): 1098-101.
- Daftary, G. S. and H. S. Taylor (2006). "Endocrine regulation of HOX genes." *Endocr Rev* 27(4): 331-55.
- Dairkee, S. H., J. Seok, et al. (2008). "Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients." *Cancer Res* 68(7): 2076-80.
- De Felici, M. (2010). "Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells." *Mol Hum Reprod* 16(9): 632-6.
- De Felici, M. (2009). "Primordial germ cell biology at the beginning of the XXI century." *Int J Dev Biol* 53(7): 891-4.
- De Felici, M., A. Di Carlo, et al. (1996). "Role of stem cell factor in somatic-germ cell interactions during prenatal oogenesis." *Zygote* 4(4): 349-51.
- De Felici, M., S. Dolci, et al. (1992). "Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture." *Int J Dev Biol* 36(2): 205-13.
- De Felici, M., D. Farini, et al. (2009). "In or out stemness: comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells." *Curr Stem Cell Res Ther* 4(2): 87-97.
- De Felici, M., F. G. Klinger, et al. (2005). "Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death." *Reprod Biomed Online* 10(2): 182-91.
- De Felici, M. and M. Pesce (1994). "Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation." *Prog Growth Factor Res* 5(2): 135-43.
- De Felici, M. and M. Pesce (1994). "Interactions between migratory primordial germ cells and cellular substrates in the mouse." *Ciba Found Symp* 182: 140-50; discussion 150-3.



- Dechaud, H., C. Ravard, et al. (1999). "Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG)." *Steroids* 64(5): 328-34.
- Degen, G. H., P. Janning, et al. (2002). "Integration of mechanistic data in the toxicological evaluation of endocrine modulators." *Toxicol Lett* 127(1-3): 225-37.
- Derheimer, F. A. and M. B. Kastan (2010) "Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity." *FEBS Lett* 584(17): 3675-81.
- Dietrich, A. J., E. Kok, et al. (1992). "The sequential appearance of components of the synaptonemal complex during meiosis of the female rat." *Genome* 35(3): 492-7.
- Dolci, S., M. Pesce, et al. (1993). "Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on in vitro proliferation of mouse primordial germ cells." *Mol Reprod Dev* 35(2): 134-9.
- Domoradzki, J. Y., L. H. Pottenger, et al. (2003). "Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-mono-glucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages." *Toxicol Sci* 76(1): 21-34.
- Domoradzki, J. Y., C. M. Thornton, et al. (2004). "Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal sprague-dawley rats following oral administration." *Toxicol Sci* 77(2): 230-42.
- ## E
- Ebenezer, I. S., R. F. Parrott, et al. (1999). "Effects of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT on operant food intake in food-deprived pigs." *Physiol Behav* 67(2): 213-7.
- EFSA (29 January 2007 ). "Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE Q-2005-100 (doi:10.2903/j.efsa.2007.428).
- Eichenlaub-Ritter, U., E. Vogt, et al. (2008). "Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy." *Mutat Res* 651(1-2): 82-92.
- Eijpe, M., C. Heyting, et al. (2000). "Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes." *J Cell Sci* 113 ( Pt 4): 673-82.
- Eijpe, M., H. Offenberger, et al. (2000). "Localisation of RAD50 and MRE11 in spermatocyte nuclei of mouse and rat." *Chromosoma* 109(1-2): 123-32.
- Eijpe, M., H. Offenberger, et al. (2003). "Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3." *J Cell Biol* 160(5): 657-70.
- Engel, S. M., B. Levy, et al. (2006). "Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid." *Reprod Toxicol* 21(1): 110-2.
- Eppig, J. J., M. O'Brien, et al. (1996). "Mammalian oocyte growth and development in vitro." *Mol Reprod Dev* 44(2): 260-73.
- Eppig, J. J. and M. J. O'Brien (1996). "Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles." *Biol Reprod* 54(1): 197-207.
- Eppig, J. J., R. M. Schultz, et al. (1996). "Maturation of mouse oocytes in serum-free medium." *Hum Reprod* 11(5): 1139-40.
- ## F
- Fawcett, D. W. (1956). "The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes." *J Biophys Biochem Cytol* 2(4): 403-6.
- FDA (2010). "Update on Bisphenol A for Use in Food Contact Applications U.S. Food and Drug Administration January 2010" <http://www.fda.gov/downloads/NewsEvents/PublicHealthFocus/UCM197778.pdf>.
- Felici, M. D., A. D. Carlo, et al. (1999). "Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo." *Cell Death Differ* 6(9): 908-15.
- Fent, G., W. J. Hein, et al. (2003). "Fate of 14C-bisphenol A in soils." *Chemosphere* 51(8): 735-46.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, et al. (2004). "H2AX: the histone guardian of the genome." *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 959-67.
- Fernandez-Capetillo, O. and A. Nussenzweig (2004). "Aging counts on chromosomes." *Nat Genet* 36(7): 672-4.
- Fernandez-Capetillo, O. and A. Nussenzweig (2004). "Linking histone deacetylation with the repair of DNA breaks." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6): 1427-8.
- Froenicke, L., L. K. Anderson, et al. (2002). "Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting." *Am J Hum Genet* 71(6): 1353-68.
- Fromme, H., T. Kuchler, et al. (2002). "Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment." *Water Res* 36(6): 1429-38.
- Fujioka, T., T. Soh, et al. (2004). "Function of TGF-beta2 in the growth of chicken primordial germ cells and germinal ridge stroma cells during embryonic development." *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301(4): 290-6.
- Funabashi, T., A. Sano, et al. (2003). "Bisphenol A increases progesterone receptor immunoreactivity in the hypothalamus in a dose-dependent manner and affects sexual behaviour in adult ovariectomized rats." *J Neuroendocrinol* 15(2): 134-40.
- Fung, E. Y., N. O. Ewoldsen, et al. (2000). "Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant." *J Am Dent Assoc* 131(1): 51-8.
- ## G
- Garcia-Cruz, R., M. A. Brieno, et al. (2010) "Dynamics of cohesin proteins REC8, STAG3, SMC1 beta and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes." *Hum Reprod* 25(9): 2316-27.
- Garcia-Cruz, R., I. Roig, et al. (2009). "ATR, BRCA1 and gammaH2AX localize to unsynapsed chromosomes at the pachytene stage in human oocytes." *Reprod Biomed Online* 18(1): 37-44.
- Garcia Caldes, M. and I. Roig (2007) "La gametogénesis femenina. Bases celulares y genéticas." *Obstetricia y Medicina materno-fetal*: 107-1115.

- Garcia, M., A. Dietrich, et al. (1989). "Nucleolar structures in chromosome and SC preparations from human oocytes at first meiotic prophase." *Hum Genet* 82(2): 147-53.
- Garcia, M., A. J. Dietrich, et al. (1987). "Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy." *Hum Genet* 77(3): 223-32.
- Garchon, H. J. and M. M. Davis (1989). "The XLR gene product defines a novel set of proteins stabilized in the nucleus by zinc ions." *J Cell Biol* 108(3): 779-87.
- Garchon, H. J., E. Loh, et al. (1989). "The XLR sequence family: dispersion on the X and Y chromosomes of a large set of closely related sequences, most of which are pseudogenes." *Nucleic Acids Res* 17(23): 9871-88.
- Ghafari, F., C. G. Gutierrez, et al. (2007). "Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one." *BMC Dev Biol* 7: 87.
- Giampietri, C., M. Levrero, et al. (2000). "E1A stimulates FGF-2 release promoting differentiation of primary endothelial cells." *Cell Death Differ* 7(3): 292-301.
- Gianaroli, L., M. C. Magli, et al. (2010). "Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process." *Hum Reprod* 25(9): 2374-86.
- Goedecke, W., M. Eijpe, et al. (1999). "Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis." *Nat Genet* 23(2): 194-8.
- Goodson, A., H. Robin, et al. (2004). "Migration of bisphenol A from can coatings--effects of damage, storage conditions and heating." *Food Addit Contam* 21(10): 1015-26.
- Goodson, A., W. Summerfield, et al. (2002). "Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods." *Food Addit Contam* 19(8): 796-802.
- Greenfeld, C. and J. A. Flaws (2004). "Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary." *Bioessays* 26(8): 829-32.
- Greschik, H., J. M. Wurtz, et al. (2002). "Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3." *Mol Cell* 9(2): 303-13.
- Gruber, S., C. H. Haering, et al. (2003). "Chromosomal cohesin forms a ring." *Cell* 112(6): 765-77.
- Guiliano, D., M. Ganatra, et al. (1999). "Chemiluminescent detection of sequential DNA hybridizations to high-density, filter-arrayed cDNA libraries: a subtraction method for novel gene discovery." *Biotechniques* 27(1): 146-52.
- Guobing X, J. S., Guohua H, Lixing Z, Tongjun W, Zhijun Z. (2005). "Investigation into serum BPA and sex hormone levels of workers in epoxy resin manufacturing." *J. Environ. Occup. Med* 22: 295-298.
- Gupta, C. (2000). "Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals." *Proc Soc Exp Biol Med* 224(2): 61-8.
- phthalates." *Folia Histochem Cytobiol* 47(5): S67-74.
- Haering, C. H., J. Lowe, et al. (2002). "Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex." *Mol Cell* 9(4): 773-88.
- Hamer, G., H. B. Kal, et al. (2004). "Ataxia telangiectasia mutated expression and activation in the testis." *Biol Reprod* 70(4): 1206-12.
- Hammer, S., N. Dorrani, et al. (2003). "Rett syndrome in a 47,XXX patient with a de novo MECP2 mutation." *Am J Med Genet A* 122A(3): 223-6.
- Hartshorne, G. M., A. L. Barlow, et al. (1999). "Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture." *Hum Reprod* 14(1): 172-82.
- Hassold, T., L. Judis, et al. (2004). "Cytological studies of meiotic recombination in human males." *Cytogenet Genome Res* 107(3-4): 249-55.
- Hawkins, W. B., J. H. Rodgers, Jr., et al. (1997). "Design and construction of wetlands for aqueous transfers and transformations of selected metals." *Ecotoxicol Environ Saf* 36(3): 238-48.
- He, B., S. Rhodes-Brower, et al. (2003). "Octamethylcyclotetrasiloxane exhibits estrogenic activity in mice via ERalpha." *Toxicol Appl Pharmacol* 192(3): 254-61.
- Heyting, C., A. J. Dietrich, et al. (1989). "Synaptonemal complex proteins." *Genome* 31(1): 81-7.
- Hiroi, H., O. Tsutsumi, et al. (1999). "Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta." *Endocr J* 46(6): 773-8.
- Hirooka, T., H. Nagase, et al. (2005). "Biodegradation of bisphenol A and disappearance of its estrogenic activity by the green alga *Chlorella fusca* var. *vacuolata*." *Environ Toxicol Chem* 24(8): 1896-901.
- Ho, S. M., W. Y. Tang, et al. (2006). "Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4." *Cancer Res* 66(11): 5624-32.
- Hoffmann, E. R. and R. H. Borts (2004). "Meiotic recombination intermediates and mismatch repair proteins." *Cytogenet Genome Res* 107(3-4): 232-48.
- Hofmann, M. C., L. Braydich-Stolle, et al. (2005). "Immortalization of mouse germ line stem cells." *Stem Cells* 23(2): 200-10.
- Honma, S., A. Suzuki, et al. (2002). "Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction." *Reprod Toxicol* 16(2): 117-22.
- Horard, B. and J. M. Vanacker (2003). "Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand." *J Mol Endocrinol* 31(3): 349-57.
- Houmar, B., C. Small, et al. (2009). "Global gene expression in the human fetal testis and ovary." *Biol Reprod* 81(2): 438-43.
- Howard, B., N. D. Wilson, et al. "Relationships between conversion, temperature and optical properties during composite

## H

- Habert, R., V. Muczynski, et al. (2009). "Adverse effects of endocrine disruptors on the foetal testis development: focus on the

- photopolymerization." *Acta Biomater* 6(6): 2053-9.
- Howdeshell, K. L., J. Furr, et al. (2008). "Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat." *Toxicol Sci* 102(2): 371-82.
- Howdeshell, K. L., A. K. Hotchkiss, et al. (1999). "Exposure to bisphenol A advances puberty." *Nature* 401(6755): 763-4.
- Howdeshell, K. L., P. H. Peterman, et al. (2003). "Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature." *Environ Health Perspect* 111(9): 1180-7.
- Hunt, P. A. and T. J. Hassold (2002). "Sex matters in meiosis." *Science* 296(5576): 2181-3.
- Hunt, P. A., K. E. Koehler, et al. (2003). "Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse." *Curr Biol* 13(7): 546-53.
- Hunt, P. A., M. Susiarjo, et al. (2009). "The bisphenol A experience: a primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction." *Biol Reprod* 81(5): 807-13.
- Hunter, N. and R. H. Borts (1997). "Mlh1 is unique among mismatch repair proteins in its ability to promote crossing-over during meiosis." *Genes Dev* 11(12): 1573-82.
- Hupponen, J. and P. Aarnisalo (2004). "Dimerization modulates the activity of the orphan nuclear receptor ERRgamma." *Biochem Biophys Res Commun* 314(4): 964-70.
- Hupponen, J., G. Wohlfahrt, et al. (2004). "Requirements for transcriptional regulation by the orphan nuclear receptor ERRgamma." *Mol Cell Endocrinol* 219(1-2): 151-60.
- ## I
- Ikezuki, Y., O. Tsutsumi, et al. (2002). "Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure." *Hum Reprod* 17(11): 2839-41.
- Imanaka, M., K. Sasaki, et al. (2001). "[Determination of bisphenol A in foods using GC/MS]." *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42(2): 71-8.
- Inoue, K., M. Kawaguchi, et al. (2003). "Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography-mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 798(1): 17-23.
- Inoue, K., M. Wada, et al. (2002). "Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 773(2): 97-102.
- Inoue, K., A. Yamaguchi, et al. (2001). "Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 765(2): 121-6.
- Iso, T., K. Futami, et al. (2007). "Modulation of the expression of bloom helicase by estrogenic agents." *Biol Pharm Bull* 30(2): 266-71.
- Iso, T., T. Watanabe, et al. (2006). "DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity." *Biol Pharm Bull* 29(2): 206-10.
- Ivanov, D. and K. Nasmyth (2005). "A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome." *Cell* 122(6): 849-60.
- ## J
- Jewgenow, K., L. M. Penfold, et al. (1998). "Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation." *J Reprod Fertil* 112(1): 39-47.
- John, H., K. Cammann, et al. (1998). "Development and review of radioimmunoassay of 12-S-hydroxyheptadecatrienoic acid." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 56(2-3): 53-76.
- Johnson, J., J. Canning, et al. (2004). "Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary." *Nature* 428(6979): 145-50.
- Johnson, J. E., H. L. Higdon, 3rd, et al. (2004). "Expectations for oocyte fertilization and embryo cleavage after whole sperm versus sperm head intracytoplasmic sperm injection." *Fertil Steril* 82(5): 1412-7.
- ## K
- Kang, J. H., Y. Katayama, et al. (2006). "Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals." *Toxicology* 217(2-3): 81-90.
- Kang, J. H., F. Kondo, et al. (2006). "Human exposure to bisphenol A." *Toxicology* 226(2-3): 79-89.
- Kang, J. H., N. Ri, et al. (2004). "Streptomyces sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability." *Lett Appl Microbiol* 39(2): 178-80.
- Kastan, M. B. (2008). "DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture." *Mol Cancer Res* 6(4): 517-24.
- Kastan, M. B. and D. S. Lim (2000). "The many substrates and functions of ATM." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 179-86.
- Kastan, M. B., D. S. Lim, et al. (2001). "ATM--a key determinant of multiple cellular responses to irradiation." *Acta Oncol* 40(6): 686-8.
- Kawahata, H., H. Ohta, et al. (2004). "Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki Islands, Japan--within coral reefs and adjacent river mouths." *Chemosphere* 55(11): 1519-27.
- Keegan, K. S., D. A. Holtzman, et al. (1996). "The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes." *Genes Dev* 10(19): 2423-37.
- Keeney, S. (2001). "Mechanism and control of meiotic recombination initiation." *Curr Top Dev Biol* 52: 1-53.
- Keeney, S., F. Baudat, et al. (1999). "A mouse homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* meiotic recombination DNA transesterase Spo11p." *Genomics* 61(2): 170-82.
- Keeney, S., C. N. Giroux, et al. (1997). "Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family." *Cell* 88(3): 375-84.
- Keeney, S. and M. J. Neale (2006). "Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and

- regulation." *Biochem Soc Trans* 34(Pt 4): 523-5.
- Kim, J. Y., P. Pfeiffer, et al. (2003). "Effect of laboratory procedures and thermocycling on the shear bond strength of resin-metal bonding systems." *J Prosthet Dent* 90(2): 184-9.
- Kim, K. B., K. W. Seo, et al. (2003). "Estrogenic effects of phenolic compounds on glucose-6-phosphate dehydrogenase in MCF-7 cells and uterine glutathione peroxidase in rats." *Chemosphere* 50(9): 1167-73.
- Kim, Y. H., C. S. Kim, et al. (2003). "Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine." *Biochem Biophys Res Commun* 312(2): 441-8.
- Kolas, N. K. and P. E. Cohen (2004). "Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination." *Cytogenet Genome Res* 107(3-4): 216-31.
- Kolas, N. K., L. Yuan, et al. (2004). "Male mouse meiotic chromosome cores deficient in structural proteins SYCP3 and SYCP2 align by homology but fail to synapse and have possible impaired specificity of chromatin loop attachment." *Cytogenet Genome Res* 105(2-4): 182-8.
- Kroger, D., A. Katerkamp, et al. (1998). "Surface investigations on the development of a direct optical immunosensor." *Biosens Bioelectron* 13(10): 1141-7.
- Kuiper, G. G., P. J. Shughrue, et al. (1998). "The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems." *Front Neuroendocrinol* 19(4): 253-86.
- Kurebayashi, H., H. Betsui, et al. (2003). "Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide." *Toxicol Sci* 73(1): 17-25.
- Kurilo, L. F. (1981). "Oogenesis in antenatal development in man." *Hum Genet* 57(1): 86-92.
- Kuruto-Niwa, R., Y. Tateoka, et al. (2007). "Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum." *Chemosphere* 66(6): 1160-4.
- Kuznetsov, S., M. Pellegrini, et al. (2007). "RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females." *J Cell Biol* 176(5): 581-92.
- L**
- Lambrot, R., V. Muczynski, et al. (2009). "Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production." *Environ Health Perspect* 117(1): 32-7.
- Lammers, J. H., M. van Aalderen, et al. (1995). "A change in the phosphorylation pattern of the 30000-33000 Mr synaptonemal complex proteins of the rat between early and mid-pachytene." *Chromosoma* 104(3): 154-63.
- Lammi, J., J. Huppunen, et al. (2004). "Regulation of the osteopontin gene by the orphan nuclear receptor NURR1 in osteoblasts." *Mol Endocrinol* 18(6): 1546-57.
- Lammi, J., A. M. Rajalin, et al. (2007). "Cross-talk between the NR3B and NR4A families of orphan nuclear receptors." *Biochem Biophys Res Commun* 359(2): 391-7.
- Lao, J. P. and N. Hunter "Trying to avoid your sister." *PLoS Biol* 8(10): e1000519.
- Latella, L., A. Sacco, et al. (2001). "Reconstitution of cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle." *Mol Cell Biol* 21(16): 5631-43.
- Lawrie, N. M., C. Tease, et al. (1995). "Chiasma frequency, distribution and interference maps of mouse autosomes." *Chromosoma* 104(4): 308-14.
- Lawson, C., M. Gieske, et al. (2011). "Gene expression in the fetal mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A." *Biol Reprod* 84(1): 79-86.
- Lee, H. B. and T. E. Peart (2000). "Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry." *J AOAC Int* 83(2): 290-7.
- Lee, M. H., S. W. Chung, et al. (2003). "Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca2+." *Immunology* 109(1): 76-86.
- Lee, M. R., Y. J. Kim, et al. (2003). "An in vitro bioassay for xenobiotics using the SXR-driven human CYP3A4/lacZ reporter gene." *Int J Toxicol* 22(3): 207-13.
- Lehmann, L. and M. Metzler (2004). "Bisphenol A and its methylated congeners inhibit growth and interfere with microtubules in human fibroblasts in vitro." *Chem Biol Interact* 147(3): 273-85.
- Lehraiki, A., C. Racine, et al. (2009). "Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism." *Toxicol Sci* 111(2): 372-82.
- Lemmen, J. G., R. J. Arends, et al. (2004). "In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and bisphenol A." *Environ Health Perspect* 112(15): 1544-9.
- Lenie, S., R. Cortvriendt, et al. (2008). "Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities." *Mutat Res* 651(1-2): 71-81.
- Lenzi, M. L., J. Smith, et al. (2005). "Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis in human oocytes." *Am J Hum Genet* 76(1): 112-27.
- Li, M., S. Li, et al. (2009). "Bub3 is a spindle assembly checkpoint protein regulating chromosome segregation during mouse oocyte meiosis." *PLoS One* 4(11): e7701.
- Liebe, B., M. Alsheimer, et al. (2004). "Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements." *Mol Biol Cell* 15(2): 827-37.
- Liebe, B., G. Petukhova, et al. (2006). "Mutations that affect meiosis in male mice influence the dynamics of the mid-preleptotene and bouquet stages." *Exp Cell Res* 312(19): 3768-81.
- Lin, F. M., Y. J. Lai, et al. (2010). "Yeast axial-element protein, Red1, binds SUMO chains to

- promote meiotic interhomologue recombination and chromosome synapsis." *EMBO J* 29(3): 586-96.
- Lipkin, S. M., P. B. Moens, et al. (2002). "Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice." *Nat Genet* 31(4): 385-90.
- Liu, Y., D. M. Virshup, et al. (2002). "Regulation of BRCA1 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 1alpha." *Cancer Res* 62(22): 6357-61.
- Liu, Y. and S. C. West (2002). "Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair." *Breast Cancer Res* 4(1): 9-13.
- Liu, Z., M. S. Wolff, et al. (2005). "Analysis of environmental biomarkers in urine using an electrochemical detector." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 819(1): 155-9.
- Lonergan, P., P. Monaghan, et al. (1994). "Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro." *Mol Reprod Dev* 37(1): 48-53.
- Lovasco, L. A., K. A. Seymour, et al. (2010). "Accelerated ovarian aging in the absence of the transcription regulator TAF4B in mice." *Biol Reprod* 82(1): 23-34.
- Lund, S. A., J. Murdoch, et al. (1999). "Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function." *Biol Reprod* 61(2): 388-92.
- Lynn, A., T. Ashley, et al. (2004). "Variation in human meiotic recombination." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5: 317-49.
- Lynn, A., K. E. Koehler, et al. (2002). "Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates." *Science* 296(5576): 2222-5.
- Lyrakou, S., M. A. Hulten, et al. (2002). "Growth factors promote meiosis in mouse fetal ovaries in vitro." *Mol Hum Reprod* 8(10): 906-11.
- ## M
- Mahadevaiah, S. K., J. M. Turner, et al. (2001). "Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis." *Nat Genet* 27(3): 271-6.
- Marcon, E. and P. B. Moens (2005). "The evolution of meiosis: recruitment and modification of somatic DNA-repair proteins." *Bioessays* 27(8): 795-808.
- Mariscal-Arcas, M., A. Rivas, et al. (2009). "Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain." *Food Chem Toxicol* 47(2): 506-10.
- Markey, C. M., M. A. Coombs, et al. (2003). "Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs." *Evol Dev* 5(1): 67-75.
- Markey, C. M., P. R. Wadia, et al. (2005). "Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract." *Biol Reprod* 72(6): 1344-51.
- Markowitz, S. B. (2005). "Corrections to: Markowitz SB, Levin K. Continued epidemic of bladder cancer in workers exposed to ortho-toluidine in a chemical factory. *J Occup Environ Med* 2004;46:154-160." *J Occup Environ Med* 47(9): 875-7.
- Martindale, D. W., M. D. Wilson, et al. (2000). "Comparative genomic sequence analysis of the Williams syndrome region (LIMK1-RFC2) of human chromosome 7q11.23." *Mamm Genome* 11(10): 890-8.
- Matsui, T. and S. Yamagishi (2011). "Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is preserved by partial, but not full peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist." *Int J Cardiol* 146(1): 109-10.
- Matsui, Y. (2010). "The molecular mechanisms regulating germ cell development and potential." *J Androl* 31(1): 61-5.
- Matsumoto, A., N. Kunugita, et al. (2003). "Bisphenol A levels in human urine." *Environ Health Perspect* 111(1): 101-4.
- McLaughlin, M. and E. E. Telfer (2010). "Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system." *Reproduction* 139(6): 971-8.
- McVean, G. (2010). "What drives recombination hotspots to repeat DNA in humans?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1544): 1213-8.
- Meistrich, M. L., M. E. van Beek, et al. (1990). "Low levels of chromosomal mutations in germ cells derived from doxorubicin-treated stem spermatogonia in the mouse." *Cancer Res* 50(2): 370-4.
- Miller, A. P., D. King, et al. (2007). "Aged rats lose vasoprotective and anti-inflammatory actions of estrogen in injured arteries." *Menopause* 14(2): 251-60.
- Miodovnik, A., S. M. Engel, et al. "Endocrine disruptors and childhood social impairment." *Neurotoxicology*.
- Miyamoto, T., T. Shiozawa, et al. (2006). "Estrogen up-regulates mismatch repair activity in normal and malignant endometrial glandular cells." *Endocrinology* 147(10): 4863-70.
- Miyano, T. (2005). "JSAR Outstanding Research Award. In vitro growth of mammalian oocytes." *J Reprod Dev* 51(2): 169-76.
- Mlynarcikova, A., M. Fickova, et al. (2005). "Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors." *Endocr Regul* 39(1): 21-32.
- Mlynarcikova, A., E. Nagyova, et al. (2009). "Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes." *Toxicol In Vitro* 23(3): 371-7.
- Moens, C. B. (2001). "Well developed: the SDB reaches 60. Society for Developmental Biology." *Trends Genet* 17(10): 559-61.
- Moens, P. B., M. Tarsounas, et al. (1999). "The association of ATR protein with mouse meiotic chromosome cores." *Chromosoma* 108(2): 95-102.
- Mohri, T. and S. Yoshida (2005). "Estrogen and bisphenol A disrupt spontaneous [Ca(2+)](i) oscillations in mouse oocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 326(1): 166-73.
- Moniruzzaman, M. and T. Miyano (2007). "KIT-KIT ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles." *J Reprod Dev* 53(6): 1273-81.

- Moniruzzaman, M., K. Sakamaki, et al. (2007). "Oocyte growth and follicular development in KIT-deficient Fas-knockout mice." *Reproduction* 133(1): 117-25.
- Morck, T. J., G. Sorda, et al. (2010). "Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A." *Reprod Toxicol* 30(1): 131-7.
- Mroz, K., L. Carrel, et al. (1999). "Germ cell development in the XXY mouse: evidence that X chromosome reactivation is independent of sexual differentiation." *Dev Biol* 207(1): 229-38.
- Mroz, K., T. J. Hassold, et al. (1999). "Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors." *Hum Reprod* 14(5): 1151-6.
- Mueller, S. O., J. A. Clark, et al. (2002). "Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha." *Endocrinology* 143(6): 2357-65.
- Mueller, S. O., J. A. Katzenellenbogen, et al. (2004). "Endogenous estrogen receptor beta is transcriptionally active in primary ovarian cells from estrogen receptor knockout mice." *Steroids* 69(10): 681-6.
- Mueller, S. O. and K. S. Korach (2001). "Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice." *Curr Opin Pharmacol* 1(6): 613-9.
- Munoz-de-Toro, M., C. M. Markey, et al. (2005). "Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice." *Endocrinology* 146(9): 4138-47.
- Myers, J. P., F. S. vom Saal, et al. (2009). "Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A." *Environ Health Perspect* 117(3): 309-15.
- ## N
- Naciff, J. M., M. L. Jump, et al. (2002). "Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat." *Toxicol Sci* 68(1): 184-99.
- Nagaraja, T. G., A. B. Beharka, et al. (1999). "Bacterial flora of liver abscesses in feedlot cattle fed tylosin or no tylosin." *J Anim Sci* 77(4): 973-8.
- Nagaraju, G., A. Hartlerode, et al. (2009). "XRCC2 and XRCC3 regulate the balance between short- and long-tract gene conversions between sister chromatids." *Mol Cell Biol* 29(15): 4283-94.
- Navas, E., L. Salleras, et al. (2007). "Cost-effectiveness analysis of inactivated virosomal subunit influenza vaccination in children aged 3-14 years from the provider and societal perspectives." *Vaccine* 25(16): 3233-9.
- Neale, M. J. and S. Keeney (2006). "Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination." *Nature* 442(7099): 153-8.
- Neale, M. J. and S. Keeney (2009). "End-labeling and analysis of Spo11-oligonucleotide complexes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Methods Mol Biol* 557: 183-95.
- Nikaido, Y., N. Danbara, et al. (2005). "Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice." *In Vivo* 19(3): 487-94.
- Nikaido, Y., K. Yoshizawa, et al. (2004). "Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring." *Reprod Toxicol* 18(6): 803-11.
- Noguchi, K., A. Toriba, et al. (2007). "Identification of estrogenic/anti-estrogenic compounds in diesel exhaust particulate extract." *Biomed Chromatogr* 21(11): 1135-42.
- Novak, I., D. A. Lightfoot, et al. (2006). "Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis." *Stem Cells* 24(8): 1931-6.
- ## O
- Oakley, G. G. and S. M. Patrick (2010). "Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair." *Front Biosci* 15: 883-900.
- Offenberg, H. H., J. A. Schalk, et al. (1998). "SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat." *Nucleic Acids Res* 26(11): 2572-9.
- Ohno, S., C. Stenius, et al. (1962). "Early meiosis of male germ cells in fetal testis of *Felis domestica*." *Exp Cell Res* 27: 401-4.
- Okada, H., T. Tokunaga, et al. (2008). "Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma." *Environ Health Perspect* 116(1): 32-8.
- Olea, N. and M. F. Olea-Serrano (1996). "Oestrogens and the environment." *Eur J Cancer Prev* 5(6): 491-6.
- Olea, N., R. Pulgar, et al. (1996). "Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry." *Environ Health Perspect* 104(3): 298-305.
- Olesen, C., P. Nyeng, et al. (2007). "Global gene expression analysis in fetal mouse ovaries with and without meiosis and comparison of selected genes with meiosis in the testis." *Cell Tissue Res* 328(1): 207-21.
- Oliver-Bonet, M., T. Liehr, et al. (2003). "Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH." *Eur J Hum Genet* 11(11): 879-83.
- Onn Wong, K., L. Woon Leo, et al. (2005). "Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles." *Food Addit Contam* 22(3): 280-8.
- Orban, M., A. Katerkamp, et al. (1998). "Kinetic analysis of immunointeractions with covalently immobilized fatty acid-binding protein using a grating coupler sensor." *J Immunol Methods* 215(1-2): 17-26.
- Ostendorf, A., C. B. Zhang, et al. (2006). "Sympathetic cooling of complex molecular ions to millikelvin temperatures." *Phys Rev Lett* 97(24): 243005.
- Ouchi, K. and S. Watanabe (2002). "Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 780(2): 365-70.

## P

- Palanza, P. L., K. L. Howdeshell, et al. (2002). "Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice." *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 415-22.
- Parrott, J. A. and M. K. Skinner (1999). "Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis." *Endocrinology* 140(9): 4262-71.
- Pavoni, E., M. Flego, et al. (2006). "Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein." *BMC Cancer* 6: 41.
- Pelttari, J., M. R. Hoja, et al. (2001). "A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells." *Mol Cell Biol* 21(16): 5667-77.
- Pennie, W. D., T. C. Aldridge, et al. (1998). "Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements." *J Endocrinol* 158(3): R11-4.
- Perera, D., L. Perez-Hidalgo, et al. (2004). "TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role of TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint." *Mol Biol Cell* 15(4): 1568-79.
- Pesce, M., R. Canipari, et al. (1996). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells." *Development* 122(1): 215-21.
- Pesce, M. and M. De Felici (1995). "Purification of mouse primordial germ cells by MiniMACS magnetic separation system." *Dev Biol* 170(2): 722-5.
- Pesce, M., A. Di Carlo, et al. (1997). "The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture." *Mech Dev* 68(1-2): 37-44.
- Pesce, M., M. G. Farrace, et al. (1993). "Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis)." *Development* 118(4): 1089-94.
- Petronczki, M., M. F. Siomos, et al. (2003). "Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis." *Cell* 112(4): 423-40.
- Poole, A., P. van Herwijnen, et al. (2004). "Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE)." *Food Addit Contam* 21(9): 905-19.
- Pottenger, L. H., J. Y. Domoradzki, et al. (2000). "The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration." *Toxicol Sci* 54(1): 3-18.
- Powell, S. N. and L. A. Kachnic (2003). "Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation." *Oncogene* 22(37): 5784-91.
- Prieto, P., P. Shaw, et al. (2004). "Homologue recognition during meiosis is associated with a change in chromatin conformation." *Nat Cell Biol* 6(9): 906-8.
- Pulgar, R., M. F. Olea-Serrano, et al. (2000). "Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography." *Environ Health Perspect* 108(1): 21-7.

## R

- Raychoudhury, S. S., C. A. Blake, et al. (1999). "Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and Sertoli cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 157(3): 192-202.
- Revenkova, E., M. Eijpe, et al. (2001). "Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1." *Mol Cell Biol* 21(20): 6984-98.
- Revenkova, E., M. Eijpe, et al. (2004). "Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination." *Nat Cell Biol* 6(6): 555-62.
- Richter, C. A., L. S. Birnbaum, et al. (2007). "In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies." *Reprod Toxicol* 24(2): 199-224.
- Robles, A. (2011). "Presence of an extra chromosome alters meiotic DSB repair dynamics."
- Robles, P., I. Roig, et al. (2009). "Analysis of recombination along chromosome 21 during human female pachytene stage." *Reprod Biomed Online* 18(6): 784-94.
- Robles, P., I. Roig, et al. (2007). "Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements." *Reproduction* 133(5): 899-907.
- Rockmill, B., J. C. Fung, et al. (2003). "The Sgs1 helicase regulates chromosome synapsis and meiotic crossing over." *Curr Biol* 13(22): 1954-62.
- Rodrigue, A., M. Lafrance, et al. (2006). "Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo." *EMBO J* 25(1): 222-31.
- Roig, I. and M. Garcia-Caldes (2009). "Cytological techniques to study human female meiotic prophase." *Methods Mol Biol* 558: 419-31.
- Roig, I., R. Garcia, et al. (2006). "Human fetal ovarian culture permits meiotic progression and chromosome pairing process." *Hum Reprod* 21(6): 1359-67.
- Roig, I., B. Liebe, et al. (2004). "Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes." *Chromosoma* 113(1): 22-33.
- Roig, I., P. Robles, et al. (2005). "Chromosome 18 pairing behavior in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage." *Reproduction* 129(5): 565-75.
- Roig, I., I. Vanrell, et al. (2003). "The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. Stromal ovarian culture cytogenetic diagnosis." *Cytotechnology* 41(1): 45-9.
- Rubin, B. S., J. R. Lenkowski, et al. (2006). "Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A." *Endocrinology* 147(8): 3681-91.

- Rudel, R. A., J. G. Brody, et al. (2001). "Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples." *J Air Waste Manag Assoc* 51(4): 499-513.
- S**
- Schalk, J. A., A. J. Dietrich, et al. (1998). "Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat." *Chromosoma* 107(8): 540-8.
- Schalk, J. A., H. H. Offenberg, et al. (1999). "Isolation and characterization of the human SCP2 cDNA and chromosomal localization of the gene." *Mamm Genome* 10(6): 642-4.
- Scherthan, H. (2006). "Factors directing telomere dynamics in synaptic meiosis." *Biochem Soc Trans* 34(Pt 4): 550-3.
- Scherthan, H. (2007). "Telomere attachment and clustering during meiosis." *Cell Mol Life Sci* 64(2): 117-24.
- Scherthan, H. and I. Schonborn (2001). "Asynchronous chromosome pairing in male meiosis of the rat (*Rattus norvegicus*)." *Chromosome Res* 9(4): 273-82.
- Scherthan, H., A. Sfeir, et al. (2010). "Rap1-independent telomere attachment and bouquet formation in mammalian meiosis." *Chromosoma*.
- Schonfelder, G., B. Flick, et al. (2002). "In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina." *Neoplasia* 4(2): 98-102.
- Schonfelder, G., K. Friedrich, et al. (2004). "Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring." *Neoplasia* 6(5): 584-94.
- Schonfelder, G., W. Wittfoht, et al. (2002). "Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit." *Environ Health Perspect* 110(11): A703-7.
- Senbon, S., Y. Hirao, et al. (2003). "Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture." *J Reprod Dev* 49(4): 259-69.
- Senbon, S., A. Ota, et al. (2003). "Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice." *Zygote* 11(2): 139-49.
- Skaznik-Wikiel, M., J. C. Tilly, et al. (2007). "Serious doubts over 'Eggs forever?'" *Differentiation* 75(2): 93-9.
- Slaten, D., R. Parrott, et al. (1999). "Readability of skin cancer prevention brochures targeting parents of young children." *J Am Acad Dermatol* 40(6 Pt 1): 997-9.
- Small, C. L., J. E. Shima, et al. (2005). "Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad." *Biol Reprod* 72(2): 492-501.
- Smith, C. C. and H. S. Taylor (2007). "Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (*Hoxa10*) required for normal uterine development." *FASEB J* 21(1): 239-46.
- Snyder, R. W., S. C. Maness, et al. (2000). "Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats." *Toxicol Appl Pharmacol* 168(3): 225-34.
- Somova, L. and B. Bojkov (1983). "PGE2 and PGF2 alpha, cyclic nucleotides and reactivity of the rat femoral artery." *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 9(2): 36-42.
- Speed, R. M. (1985). "The prophase stages in human foetal oocytes studied by light and electron microscopy." *Hum Genet* 69(1): 69-75.
- Spinazzola, F., C. D'Amato, et al. (1989). "Plasmapheresis for late-stage trypanosomiasis." *Lancet* 1(8648): 1200.
- Spradling, A. C. (2004). "Stem cells: more like a man." *Nature* 428(6979): 133-4.
- Staples, C. A., P. B. Dorn, et al. (2000). "Bisphenol A concentrations in receiving waters near US manufacturing and processing facilities." *Chemosphere* 40(5): 521-5.
- Staples, C. A., P. B. Dorn, et al. (1998). "A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A." *Chemosphere* 36(10): 2149-73.
- Sugiura-Ogasawara, M., Y. Ozaki, et al. (2005). "Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage." *Hum Reprod* 20(8): 2325-9.
- Sun, F., M. Oliver-Bonet, et al. (2006). "Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal men." *Hum Reprod* 21(9): 2335-9.
- Sun, F., M. Oliver-Bonet, et al. (2006). "Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males." *Hum Mol Genet* 15(15): 2376-91.
- Sun, F., P. Turek, et al. (2007). "Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia." *Fertil Steril* 87(3): 565-71.
- Sun, Y., M. Irie, et al. (2004). "Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection." *Biomed Chromatogr* 18(8): 501-7.
- Susiarjo, M., T. J. Hassold, et al. (2007). "Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse." *PLoS Genet* 3(1): e5.
- Susiarjo, M. and P. Hunt (2008). "Bisphenol A exposure disrupts egg development in the mouse." *Fertil Steril* 89(2 Suppl): e97.
- Suzuki, A., A. Sugihara, et al. (2002). "Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice." *Reprod Toxicol* 16(2): 107-16.
- Suzuki, T., K. Mizuo, et al. (2003). "Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state." *Neuroscience* 117(3): 639-44.
- Svetlanov, A. and P. E. Cohen (2004). "Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis." *Exp Cell Res* 296(1): 71-9.
- Symonds, D. A., I. Merchenthaler, et al. (2008). "Methoxychlor and estradiol induce oxidative stress DNA damage in the mouse ovarian surface epithelium." *Toxicol Sci* 105(1): 182-7.
- T**
- Takao, T., W. Nanamiya, et al. (1999). "Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in young mice." *Life Sci* 65(22): 2351-7.



- Takao, T., W. Nanamiya, et al. (2003). "Exposure to the environmental estrogen bisphenol A differentially modulated estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  immunoreactivity and mRNA in male mouse testis." *Life Sci* 72(10): 1159-69.
- Takayanagi, S., T. Tokunaga, et al. (2006). "Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERR $\gamma$ ) with high constitutive activity." *Toxicol Lett* 167(2): 95-105.
- Takeuchi, T. and O. Tsutsumi (2002). "Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels." *Biochem Biophys Res Commun* 291(1): 76-8.
- Takeuchi, T., O. Tsutsumi, et al. (2006). "Elevated serum bisphenol A levels under hyperandrogenic conditions may be caused by decreased UDP-glucuronosyltransferase activity." *Endocr J* 53(4): 485-91.
- Takeuchi, T., O. Tsutsumi, et al. (2004). "Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction." *Endocr J* 51(2): 165-9.
- Takeyoshi, M., K. Yamasaki, et al. (2002). "The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions." *Toxicol Lett* 126(2): 91-8.
- Tan, F., H. Zhao, et al. (2009). "Preparation and evaluation of molecularly imprinted solid-phase microextraction fibers for selective extraction of bisphenol A in complex samples." *J Chromatogr A* 1216(30): 5647-54.
- Tanaka, M., T. Kawamoto, et al. (2010). "Distribution of <sup>14</sup>C-bisphenol A in pregnant and newborn mice." *Dent Mater* 26(6): e181-7.
- Tang, T., J. Hou, et al. (2011). "Electroenzymatic oxidation of bisphenol A (BPA) based on the hemoglobin (Hb) film in a membraneless electrochemical reactor." *J Hazard Mater* 181(1-3): 413-8.
- Tarsounas, M., T. Morita, et al. (1999). "RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes." *J Cell Biol* 147(2): 207-20.
- Tease, C. (1990). "Sex chromosome configurations in pachytene spermatocytes of an XYY mouse." *Genet Res* 56(2-3): 129-33.
- Tease, C. and G. Fisher (1989). "Further examination of the production-line hypothesis in mouse foetal oocytes. II. T(14; 15)6Ca heterozygotes." *Chromosoma* 97(4): 315-20.
- Tease, C. and G. Fisher (1991). "Two new X-autosome Robertsonian translocations in the mouse. I. Meiotic chromosome segregation in male hemizygotes and female heterozygotes." *Genet Res* 58(2): 115-21.
- Tease, C., G. Hartshorne, et al. (2006). "Altered patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes with asynapsis and/or synaptonemal complex fragmentation at pachytene." *Reprod Biomed Online* 13(1): 88-95.
- Tease, C., G. M. Hartshorne, et al. (2002). "Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes." *Am J Hum Genet* 70(6): 1469-79.
- Tease, C. and M. A. Hulten (2004). "Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells." *Cytogenet Genome Res* 107(3-4): 208-15.
- Tedesco, M., G. La Sala, et al. (2009). "STRA8 shuttles between nucleus and cytoplasm and displays transcriptional activity." *J Biol Chem* 284(51): 35781-93.
- Thomas, C. Y., M. Chouinard, et al. (2003). "Spontaneous activation and signaling by overexpressed epidermal growth factor receptors in glioblastoma cells." *Int J Cancer* 104(1): 19-27.
- Thomas, F. H. and B. C. Vanderhyden (2006). "Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth." *Reprod Biol Endocrinol* 4: 19.

## U

- Uchida, H., T. Fukuda, et al. (2001). "Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*." *Biochem Biophys Res Commun* 287(2): 355-8.
- Ueno, S., M. Kurome, et al. (2005). "Effects of maturation conditions on spindle morphology in porcine MII oocytes." *J Reprod Dev* 51(3): 405-10.

## V

- Vandenberg, L. N., I. Chahoud, et al. (2010). "Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A." *Environ Health Perspect* 118(8): 1055-70.
- Vandenberg, L. N., I. Chahoud, et al. (2010). "Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A." *Environ Health Perspect* 118(8): 1051-4.
- Vandenberg, L. N., R. Hauser, et al. (2007). "Human exposure to bisphenol A (BPA)." *Reprod Toxicol* 24(2): 139-77.
- Vandenberg, L. N., M. V. Maffini, et al. (2009). "Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption." *Endocr Rev* 30(1): 75-95.
- Vaskivuo, T. E., M. Maentausta, et al. (2005). "Estrogen receptors and estrogen-metabolizing enzymes in human ovaries during fetal development." *J Clin Endocrinol Metab* 90(6): 3752-6.
- Volkel, W., M. Kiranoglu, et al. "Determination of free and total bisphenol A in urine of infants." *Environ Res* 111(1): 143-8.
- Volkel, W., M. Kiranoglu, et al. (2008). "Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment." *Toxicol Lett* 179(3): 155-62.
- vom Saal, F. S., B. T. Akingbemi, et al. (2007). "Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure." *Reprod Toxicol* 24(2): 131-8.

## W

- Waechter, J., C. Thornton, et al. (2007). "Factors affecting the accuracy of bisphenol a and bisphenol a-monoglucuronide estimates in

- Mammalian tissues and urine samples." *Toxicol Mech Methods* 17(1): 13-24.
- Wang, C. J., P. M. Carlton, et al. (2009). "Interlock formation and coiling of meiotic chromosome axes during synapsis." *Genetics* 183(3): 905-15.
- Wang, H. and C. Hoog (2006). "Structural damage to meiotic chromosomes impairs DNA recombination and checkpoint control in mammalian oocytes." *J Cell Biol* 173(4): 485-95.
- Wang, X., M. Chinnam, et al. (2009). "Thoc1 deficiency compromises gene expression necessary for normal testis development in the mouse." *Mol Cell Biol* 29(10): 2794-803.
- Washington, W., L. Hubert, et al. (2001). "Bisphenol A binds to the low-affinity estrogen binding site." *In Vitro Mol Toxicol* 14(1): 43-51.
- Watson, C. S., N. N. Bulayeva, et al. (2007). "Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses." *Steroids* 72(2): 124-34.
- Wetherill, Y. B., B. T. Akingbemi, et al. (2007). "In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action." *Reprod Toxicol* 24(2): 178-98.
- Willhite, C. C., G. L. Ball, et al. (2008). "Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11(2): 69-146.
- Wislez, M., G. Mangiapan, et al. (1999). "[Acute respiratory distress in a patient with sickle-cell anemia]." *Rev Pneumol Clin* 55(1): 31-3.
- Wolff, M. S., J. A. Britton, et al. (2008). "Environmental exposures and puberty in inner-city girls." *Environ Res* 107(3): 393-400.
- Wolff, M. S., S. L. Teitelbaum, et al. (2007). "Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls." *Environ Health Perspect* 115(1): 116-21.
- Wong, E. W. and C. Y. Cheng (2010) "Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction." *Trends Pharmacol Sci*.
- Wong, M. and S. Power (2003). "A prospective randomized clinical trial to compare pre-coated and non-pre-coated brackets." *J Orthod* 30(2): 155-8; discussion 128.
- Wu, L. and I. D. Hickson (2003). "The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination." *Nature* 426(6968): 870-4.
- X**
- Xu, J., Y. Osuga, et al. (2002). "Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells." *Biochem Biophys Res Commun* 292(2): 456-62.
- Xu, X., A. P. Hsia, et al. (1995). "Meiotic recombination break points resolve at high rates at the 5' end of a maize coding sequence." *Plant Cell* 7(12): 2151-61.
- Y**
- Yamada, H., I. Furuta, et al. (2002). "Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester." *Reprod Toxicol* 16(6): 735-9.
- Yamashita, U., T. Sugiura, et al. (2005). "Effect of endocrine disruptors on macrophage functions in vitro." *J UOEH* 27(1): 1-10.
- Yang, F., R. De La Fuente, et al. (2006). "Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis." *J Cell Biol* 173(4): 497-507.
- Yang, F. and P. J. Wang (2009). "The Mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond." *Genome Dyn* 5: 69-80.
- Yang, M., S. Y. Kim, et al. (2003). "Biological monitoring of bisphenol a in a Korean population." *Arch Environ Contam Toxicol* 44(4): 546-51.
- Yang, M., M. S. Park, et al. (2006). "Endocrine disrupting chemicals: human exposure and health risks." *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 24(2): 183-224.
- Yang, Z., L. Tang, et al. (2010) "Monitoring homologous recombination in rice (*Oryza sativa* L.)." *Mutat Res* 691(1-2): 55-63.
- Yim, S. H., H. J. Kim, et al. (2003). "Microbial metabolism of the environmental estrogen bisphenol A." *Arch Pharm Res* 26(10): 805-8.
- Ying, G. G., R. S. Kookana, et al. (2003). "Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material." *Water Res* 37(15): 3785-91.
- Yoshida, K., G. Kondoh, et al. (1998). "The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis." *Mol Cell* 1(5): 707-18.
- Yu, H., M. Wang, et al. "OsSPO11-1 is essential for both homologous chromosome pairing and crossover formation in rice." *Chromosoma* 119(6): 625-36.
- Yuan, L., J. G. Liu, et al. (2002). "Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3." *Science* 296(5570): 1115-8.
- Yuan, L., J. G. Liu, et al. (2000). "The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility." *Mol Cell* 5(1): 73-83.
- Z**
- Zalko, D., A. M. Soto, et al. (2003). "Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice." *Environ Health Perspect* 111(3): 309-19.
- Zeuner, A., M. Signore, et al. (2007). "Chemotherapy-induced thrombocytopenia derives from the selective death of megakaryocyte progenitors and can be rescued by stem cell factor." *Cancer Res* 67(10): 4767-73.
- Zhang, J., G. M. Cooke, et al. (2010) "GC-MS analysis of bisphenol A in human placental and fetal liver samples." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879(2): 209-14.
- Zhang, J., J. Liu, et al. (1995). "Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova." *J Assist Reprod Genet* 12(6): 361-8.
- Zhang, Z., S. M. Rhind, et al. (2011) "Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry." *Anal Chim Acta* 685(1): 29-35.

## Agradecimientos personales

Dentro del todo el caos, estrés y el largo proceso de escritura de la tesis probablemente lo más difícil es escribir esta sección. Durante todo este tiempo muchas personas han estado implicadas y como seguramente me olvidare de alguno, primero diré **GRACIAS A TODOS**.

De manera, particular

- A la Dra. Montserrat Garcia Caldés, jefa, jefa, jefa, muchos rifi-rafes, falta de acuerdo y personalidades diferentes, han permitido que aprenda mucho, si aún que usted no lo crea lo estoy diciendo, solo tengo que decir gracias me has enseñado mucho y no solamente en ciencia (siempre seré el último hijo de monoparental).
- Al Dr. Jesús Flavio Martínez Morales, mi jefe en México, bueno como uno con uno no es suficiente, pues yo quería dos jajaja, mil gracias por todo jeferringui de verdad.
- En España al equipo del lab, Angels y Ana, sé que soy un pesado=intenso pero por fin se libraran de mí, muchas gracias por toda la ayuda que me han dado. En México pues Alis, mi central de información y atención al cliente, me has salvado de unas bien gordas, gracias, mil gracias.
- A las mis compañeros de los laboratorios a ambos lados del atlántico, he aprendido muchas cosas de ustedes tanto buenas como malas pero finalmente me han ayudado a conseguir mis objetivos. El mencionar nombres es difícil pero saben que todos están incluidos!!! Especial dedicatoria para la gente del grupo, Pedro, Raquel, Nuria y el combo Reprotox.
- Un particular agradecimiento a Ignasi, la jefa y yo hemos intenseado a morir pero como todo en la vida el final llego (al menos es crees tú. jajajja).
- A mis amigos tanto los de México como los de España gracias por estar conmigo y apoyarme en la buenas y en las malas, esos son los amigos de verdad. Gracias Felipe, Lulú, Gaby, Gon, Rita, Agustín, David, "Padre Alfredo", Elena y Libert, saben que los quiero mucho.
- Bebe, mi amor, sabes que no hay espacio para decir lo mucho que me has ayudado, apoyado y aguantado. Gracias Tontirrix.
- Finalmente pero no al último a mi familia mamá, papá han sido unos años más que difíciles pero otra etapa ha sido concluida y como todos sabemos, nosotros somos lo que en casa hemos aprendido, gracias por todo, por ustedes soy quien soy, y soy muy afortunado. Gracias papá, gracias mamá.