

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD, MADURACIÓN Y EFECTO GENOTÓXICO EN
OVOCITOS Y CÉLULAS DEL CÚMULO PORCINOS EXPUESTOS A SULFONATO
DE PERFLUOROCTANO (PFOS) *IN VITRO*.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA

BIÓLOGO EXPERIMENTAL: MARIO TETELTITLA SILVESTRE

DIRECTORA

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ

ASESORES

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

México D.F., 5 de Diciembre de 2014

MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES

DIRECTORA:

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

Correo: duco@xanum.uam.mx

ASESORES:

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

Correo: bet@xanum.uam.mx

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Profesor Titular “C”

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental

Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. UNAM.

Correo: maal@unam.mx

AGRADECIMIENTOS

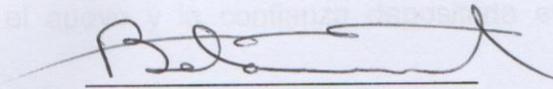
Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Celular S-252 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y el laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de estudios Superiores-Zaragoza campus II de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este estudio fue apoyado por el CONACYT. Proyecto: CB-2012-01-180043; y beca Otorgada por el CONACYT a Mario Teteltitla Silvestre (Num: 302939 CVU: 509499).

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 003797”

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD, MADURACIÓN Y EFECTO GENOTÓXICO EN OVOCITOS Y CÉLULAS DEL CÚMULO PORCINOS EXPUESTOS A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS) *IN VITRO*”** que presentó **Mario Teteltila Silvestre** el día 05 de Diciembre de 2014



PRESIDENTE

Dr. José Miguel Betancourt Rule

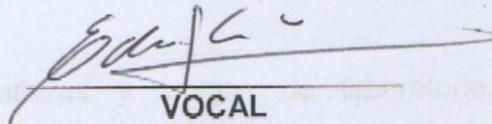
Departamento de Ciencias de la salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma metropolitana-Iztapalapa



SECRETARIO

Dr. Mario Agustín Alfamirano Lozano

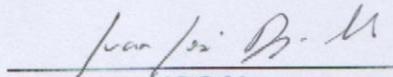
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental
Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. UNAM.



VOCAL

Dr. Eduardo Casas Hernández

Departamento de Ciencias de la salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental
Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer enormemente a todas las personas que siempre me han apoyado. A todas esas personas que me impulsaron a continuar con mis estudios y sobre todo a las personas que jamás creyeron en mí y siempre me pusieron obstáculos en el camino, ya que lejos de desanimarme me impulsaron a seguir adelante. Quiero expresar mi gratitud a las siguientes personas:

Agradezco a la Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez por dirigir el presente trabajo de Maestría, el apoyo y la confianza depositada en mí, sus consejos y paciencia.

Agradezco al Dr. José Miguel Betancourt R. por la confianza, el apoyo incondicional, sus valiosos y sabios consejos en mi vida de estudiante y personal.

Agradecimiento a la Dra. María de los Ángeles Aguilar Santamaría

Agradezco a mi familia: a mis padres: la Sra. Virginia Silvestre Medina y el Sr. Mario Teteltitla Anacleto por su apoyo incondicional, a mis hermanos: Nicolás, Cesáreo, Josefina, Inés, José Luis y Jazmín que siempre creen en mí, a todos mis sobrinos y sobrinas que me alegran la vida con sus pláticas los fines de semana.

Agradezco a mis compañeras y amigas de laboratorio, ya que su apoyo incondicional, las pláticas, los consejos y sus críticas fueron importantes para la realización de este trabajo, especialmente a la hoy Maestra Diana L. Flores M. por el apoyo brindado en el laboratorio y visitas al rastro.

A mis mejores amigos con los aún tengo el privilegio de convivir y a los que se encuentran lejos; gracias a todos por su apoyo, sus consejos, sus regaños y sus reconocimientos por los logros obtenidos en mi vida académica y personal.

Agradezco al MVZ. Trinidad Sierra Guzmán, técnico de laboratorio por el apoyo brindado en las visitas semanales al rastro para coleccionar los ovarios porcinos y al Biol. Heriberto Hernández de la Cruz por el apoyo brindado con la técnica del ensayo cometa.

Finalmente agradezco al rastro frigorífico los Arcos por la donación de los ovarios de cerdas, material primordial para la realización de este trabajo.

El tiempo jamás se detiene

*Una tarde de verano se pierde como agua entre las manos
La inmensidad del universo me asusta
La tristeza del corazón me limita
El miedo a lo desconocido me detiene.*

*Sólo el movimiento de las flores me alegra la vida
La brisa de la mañana me alienta a seguir adelante
El viento impulsa mis sueños, mientras que sus ojos me intimidan
Espero que los recuerdos no se vuelvan jeroglíficos en una pared
olvidada.*

*El tiempo jamás se detendrá
Los sueños de una nueva aventura alimentan mi espíritu
La luz de su sonrisa no me permiten miran atrás
Los anhelos de una nueva vida emocionan mi corazón.*

*El ayer se fue y no existe más
El mañana siempre será el objetivo a conseguir
Hoy sólo queda aprovechar el momento de dicha
Sólo existe el presente, nada más importa.*

MTS.

RESUMEN

El PFOS es un producto sintético, su bioacumulación en los seres humanos altera el metabolismo y la homeostasis del colesterol; en mujeres con altas concentraciones plasmáticas de PFOS disminuyó la tasa de embarazos y en hombres, se relaciona con problemas en la calidad del semen. Estudios recientes indican que el PFOS puede causar daño en la integridad del ADN de células somáticas y espermatozoides, pero no existen estudios que demuestren este efecto en gametos femeninos. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del PFOS en la viabilidad, la maduración *in vitro* (MIV) y la integridad del ADN mediante el ensayo cometa, tanto en ovocitos como en células del cúmulo (CC) expuestos a este compuesto durante la MIV. Los complejos ovocitos-células del cúmulo (COCs) se obtuvieron por punción folicular de ovarios de cerdas prepúberes. La MIV se llevó a cabo en medio TCM-199 suplementado con diferentes concentraciones (0, 12.5, 25, 50, 100, 150 y 200 μM) de PFOS durante 44 h. La viabilidad de los ovocitos, se determinó mediante la tinción con MTT y la de las CC con azul tripano. Para evaluar la MIV, los ovocitos se tiñeron con Bisbenzamide (Hoechst 33258), observando la presencia de la metafase II y el primer cuerpo polar. Para detectar el efecto genotóxico, se realizó el ensayo cometa con una concentración subletal del compuesto (23 μM) utilizando como control positivo H_2O_2 (200 μM). Previamente se descartó el efecto del diluyente (DMSO 1%). En este estudio se determinó que la concentración letal 50 (CL_{50}) para los ovocitos fue de 31 μM y para las células del cúmulo fue de 90 μM . La concentración de inhibición de la maduración 50 (CIM_{50}) fue de 11 μM . Para determinar el efecto genotóxico se evaluaron tres parámetros: número de células con daño, longitud de las caudas y el porcentaje de ADN en caudas. Los resultados indican que en las CC un $\frac{1}{4}$ de la CL_{50} (23 μM) presentó un efecto genotóxico significativo en dos parámetros evaluados: mayor número de células con daño y longitud de caudas de las mismas. En los ovocitos no se pudo determinar el efecto genotóxico. Los datos obtenidos muestran el efecto adverso del PFOS en la maduración, la viabilidad y la integridad del ADN. Las concentraciones

empleadas en este estudio están dentro del rango reportado en condiciones fisiológicas en trabajadores laboralmente expuestos (26 μ M de PFOS). Se requiere modificar las técnicas del ensayo cometa en ovocitos que permitan evaluar el efecto genotóxico.

ABSTRACT

PFOS is a synthetic product; its bioaccumulation in humans alters metabolism and cholesterol homeostasis. In women with high plasma concentrations of PFOS, pregnancy rates are decreased and in men, are related to problems in semen quality. Recent studies indicate that PFOS can damage DNA integrity in somatic cells and sperm, but there are no studies that demonstrate this effect in female gametes. Therefore the aim of the present study was to determine the effect of PFOS on viability, in vitro maturation (IVM) and DNA integrity by the comet assay in oocytes and cumulus cells (CC) exposed to this compound during IVM. Complex oocyte-cumulus cells (COCs) were obtained by puncturing ovarian follicles of prepubertal sows. IVM was performed in TCM-199 medium supplemented with different concentrations of PFOS (0, 12.5, 25, 50, 100, 150 and 200 μM) for 44 h. The oocyte viability was determined by MTT staining and CC by trypan blue. To evaluate IVM, oocytes were stained with Bisbenzamide (Hoechst 33258) to observe oocytes in metaphase II and the first polar body. Before all evaluations, the effect of diluent (1% DMSO) was discarded. To evaluate the genotoxic effect, the comet assay was performed. It was used a sublethal concentration of the compound (23 μM) and as a positive control H_2O_2 (200 μM). In this study it was determined that the lethal concentration 50 (LC_{50}) for oocytes was 31 μM and for CC was 90 μM . The concentration of maturation inhibition 50 (MIC_{50}) was 11 μM . To determine the genotoxic effect three parameters were evaluated: number of damaged cells, length tails and percentage of DNA in tails. The results indicate that in CC, $\frac{1}{4}$ of the LC_{50} (23 μM) showed a significant genotoxic effect in two parameters: increased number of damaged cells and length tails. In oocytes, the use of the comet assay was unable to determine the genotoxic effect. Therefore, results obtained demonstrate the adverse effects of PFOS in viability, oocytes maturation and DNA integrity in CC. The concentrations used in this study are within the range reported in physiological conditions in occupationally exposed workers (26 μM PFOS). As perspective some adjustments are necessary to improve the comet assay in order to assess the genotoxic effect in oocytes.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Importancia Reproducción	1
1.2 Gametogénesis.....	2
1.3 Foliculogénesis.....	2
1.4 Maduración del ovocito.....	4
1.5 Toxicología.....	6
1.6 Toxicología reproductiva.....	7
1.7 Métodos de evaluación de toxicidad.....	7
1.8 Importancia del modelo porcino	10
1.9 Daño al ADN.....	11
1.10 Técnicas de evaluación de genotoxicidad.....	12
2. Antecedentes.....	12
2.1 Compuestos perfluorados (PFCS).....	12
2.2 Efecto de los PFCS en la reproducción.....	16
3. Justificación.....	17
4. Preguntas de investigación.....	17
5. Hipótesis.....	18
6. Objetivo general.....	18
6.1 Objetivos particulares.....	18
7. Metodología.....	19
7.1 Colecta de los complejos ovocitos-células de cúmulo (COCs).....	19
7.2 Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	20
7.3 Evaluación de la viabilidad y maduración	21
7.4 Evaluación del daño al ADN	24
7.4.1 Preparación de laminillas con ovocitos y CC para el ensayo cometa.....	24
7.4.2 Lisis de los ovocitos y las células del cúmulo.....	25
7.4.3 Electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa).....	26

7.5 Tratamiento con PFOS.....	27
8. Análisis estadístico.....	28
9. Resultados.....	29
9.1 Efecto del diluyente (DMSO) en la viabilidad de los ovocitos.....	29
9.2 Efecto del PFOs en la viabilidad de los ovocitos.....	32
9.3 Efecto del diluyente (DMSO) en la maduración de los ovocitos.....	36
9.4 Efecto del PFOs en la MIV.....	39
9.5 Efecto del diluyente (DMSO) en la viabilidad de las CC.....	43
9.6 Efecto del PFOs en la viabilidad de las CC.....	44
9.7 Efecto del PFOS sobre el ADN después de la MIV mediante la prueba de cometa.....	48
9.7.1 Daño al ADN en las CC.....	48
9.7.2 Daño al ADN en los ovocitos.....	52
10. Discusión.....	53
11. Conclusiones.....	61
12. Perspectivas.....	62
13. Bibliografía.....	63
14. Anexo.....	75
14.1 Metodología.....	75
14.2 Resultados.....	76
14.3 Medios de cultivo.....	79
14.3.1 Preparación de las hormonas.....	81
14.3.2 Preparación del factor de crecimiento epidérmico (EGF)	81
14.4 Soluciones para la electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa).....	82

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATSDR: Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades.

CGP: Células germinales primordiales.

CCOs: Complejo ovocito-células del cúmulo.

CG: Células de la granulosa

GC: Gránulos corticales

CL50: Concentración letal 50

CIM50: Concentración de inhibición de la maduración 50

DMSO: Dimetilsulfóxido

EGF: Factor de crecimiento epidermal

EPA: Agencia de Protección Ambiental

FSH: Hormona Folículo Estimulante

LH: Hormona Luteinizante

PFCs: Compuestos perfluorados

PFOA: Ácido perfluorooctanoico

PFNA: Ácido perfluorononanoico

PFHxS: Perfluorohexano sulfónico

PFOs: Sulfonato de perfluorooctano

PVA: Polyvinyl alcohol

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (México)

MIV: Maduración in vitro

MI: Metafase I

MII: Metafase II

VG: Vesícula germinal

“Evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcinos expuestos a sulfonato de perfluorooctano (PFOS) *in vitro*”

1. Introducción.

1.1 Importancia de la reproducción.

Los seres vivos se caracterizan por presentar un ciclo de vida bien definido, nacen, crecen, se reproducen y mueren. Cada una de las etapas anteriores involucra una serie de cambios fisiológicos y conductuales, entre otros. Todos los seres vivos poseen la capacidad de reproducirse, y pueden hacerlo mediante dos tipos de reproducción; la asexual y la sexual. La reproducción asexual consiste en la producción de crías sin la necesidad de la unión de dos gametos, este tipo de reproducción es común en microorganismos, plantas y animales de organización simple como las planarias y estrellas de mar. La reproducción sexual, involucra la unión de los gametos masculino y femenino. Generalmente los gametos provienen de dos progenitores de la misma especie, dando origen a una recombinación genética. Antes de la unión de los gametos se requieren de varios procesos como la gametogénesis y maduración de los mismos, estos procesos son altamente especializados con la formación de gametos de buena calidad como objetivo final (Bachtrog *et al.*, 2014).

1.2 Gametogénesis.

La gametogénesis es un proceso mediante el cual se forman los gametos masculinos y femeninos. La ovogénesis es el proceso de formación de los ovocitos, este proceso es discontinuo y se inicia en la vida intrauterina, después de los primeros días post fecundación. Las células germinales primordiales (CGP) se encuentran en el epiblasto (capa externa principal del blastocisto o blástula) de donde posteriormente migran al endodermo del saco vitelino y se multiplican por mitosis. Finalmente las CGP del endodermo del saco vitelino pasan a la futura gónada indiferenciada, donde se van a diferenciar en ovogonias en los ovarios y espermatogonias en el testículo (Werven y Amon, 2011). En los humanos, al final del tercer mes de gestación, las ovogonias ya se encuentran rodeadas de una capa de células epiteliales planas precedentes de la superficie del ovario. Varios millones de ovogonias inician la primera división meiótica y aproximadamente en el 7^o mes, cada célula se encuentra en la etapa de diploteno. En esta etapa los ovocitos primarios entran en una fase de detención de la primera división meiótica hasta alcanzar la pubertad, donde por la acción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) se reanuda la meiosis, hasta su maduración (Gilbert, 2005).

1.3 Foliculogénesis.

Las hembras adultas de los mamíferos poseen ovarios con una reserva de folículos mayoritariamente inactivos que se desarrollaron durante la vida fetal o poco tiempo después del nacimiento. Algunos de estos folículos iniciarán su crecimiento continuamente hasta que esta reserva se agote (Hatzirodos *et al.*, 2014). El crecimiento del folículo primordial culmina con la ovulación o su degeneración, como ocurre con la mayoría. Dependiendo de la especie, los folículos de mayor tamaño son los encargados de la mayor producción de hormonas como los estrógenos, que

son sintetizados por los ovarios, hasta el momento en el cual el pico preovulatorio de LH aumenta, con lo cual los estrógenos disminuyen (Hafez *et al.*, 2002).

Durante la foliculogénesis el ovocito mantiene una estrecha relación con las células de la granulosa (CG), también llamadas células del cúmulo (CC), que lo rodean formando una estructura denominada complejo ovocito células de cúmulo (CCOs). Las CG mantienen una estrecha comunicación bidireccional con el ovocito, esta comunicación es crucial para la maduración y la calidad del ovocito (Devjak *et al.*, 2012). Las CG juegan un papel importante en el desarrollo del ovocito y el aporte de nutrientes, también participan en el mantenimiento del arresto meiótico, la supresión de la actividad transcripcional y la inducción de la maduración meiótica y citoplasmática del ovocito. El ovocito por su parte regula el desarrollo y actividad de las CG durante todo el curso de la foliculogénesis (Su *et al.*, 2009).

De manera particular en las hembras de cerdo, el reclutamiento de los folículos es continuo, el desarrollo de los folículos pequeños es promovido por los folículos grandes o dominantes, y el crecimiento final ocurre en un lapso que varía entre los 12 y 34 días, la duración total del crecimiento folicular de más de 20 días y quizás hasta de 6 meses. Los diversos fenómenos que están implicados en el crecimiento, maduración y luteinización del folículo de Graff (folículo ovárico maduro) son dependientes de diversos patrones específicos de secreción de hormonas como la FSH y LH, además de otras hormonas como las prostaglandinas. El papel de la hormona FSH es muy amplio, ya que participa en la formación del antro, estimula la mitosis de las CC y la formación del líquido folicular, y además induce la sensibilidad de las CC hacia la LH al incrementar el número de receptores para esta hormona. (Hafez *et al.*, 2002). En el porcino los receptores para la LH aumentan de 300 en los folículos pequeños a 10 000 en los folículos preovulatorios grandes; este incremento de los receptores para LH preparan la luteinización de las CC en respuesta a la oleada de LH para que se estimule la ovulación (Hafez *et al.*, 2002).

1.4 Maduración del ovocito.

La maduración de los ovocitos se divide en dos etapas: la primera, incluye un periodo de crecimiento, durante el cual el ovocito sintetiza y almacena grandes cantidades de ARNm latentes importantes para que el ovocito reinicie la meiosis I, aumenta el citoplasma, se forma la zona pelúcida y ocurre la proliferación del epitelio folicular y tejido adyacente. Al final del periodo de crecimiento tiene lugar la segunda etapa en la que ocurren la maduración nuclear (compuesta de dos divisiones meióticas) y la maduración citoplasmática, las cuales son prerequisites fundamentales para que se lleve a cabo la fecundación y el desarrollo embrionario (Hafez *et al.*, 2002).

En la mayoría de los mamíferos, la ovogénesis se inicia en la etapa embrionaria cuando las ovogonias después de proliferar por mitosis, originan al ovocito primario en el cual se lleva a cabo la primera división meiótica hasta la profase en el estadio de diploteno, en esta etapa los ovocitos quedan detenidos hasta el inicio de la pubertad. En esta etapa al núcleo del ovocito se le denomina vesícula germinal (VG). Durante la infancia esta etapa se mantiene hasta llegar a pubertad cuando por la influencia de las hormonas gonadotropicas, FSH y LH, se reanuda la primera división meiótica. Durante este evento se produce la ruptura de la VG y la cromatina que se encontraba difusa se condensa para formar los cromosomas y proseguir a la metafase I (MI). Al final de esta división se origina el primer cuerpo polar, que se expulsa y se inicia la segunda división meiótica hasta la metafase II (MII); en esta etapa los ovocitos quedan detenidos por segunda vez y es hasta la fecundación cuando se concluye la segunda división meiótica (Betancourt *et al.*, 2003) La maduración de los ovocitos se produce en ausencia de transcripción y es totalmente dependiente de cascadas de cinasas/fosfatasa y la activación secuencial de la traducción de los mRNAs maternos acumulados durante la profase I (Verlhac *et al.*, 2010).

La maduración citoplasmática, es un proceso muy complejo que implica una serie de acontecimientos no relacionados directamente con el progreso de la meiosis, pero que preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario. Durante la maduración citoplasmática se produce una redistribución de las mitocondrias a una posición perinuclear, que es necesaria para el progreso de la maduración (De los Reyes, 2011). Por su parte los gránulos corticales (GC) que se forman a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, y que están constituidos principalmente por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas, migran hacia la periferia del ovocito, aumentan en número y se sitúan debajo de la membrana plasmática en forma de monocapa, circunstancia que será fundamental para el bloqueo de la polispermia (Yanagimachi, 1994). La maduración citoplasmática implica además, reprogramación de la síntesis proteica. Parte del ARNm que había sido almacenado durante la fase de crecimiento comienza a transcribirse, sintetizándose nuevas proteínas que serán esenciales en el avance de la meiosis, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide. Entre estas proteínas, se encuentra el factor de crecimiento del pronúcleo masculino, que será esencial para la formación del pronúcleo masculino tras la penetración del espermatozoide (Yanagimachi, 1994; Martínez, 2002).

Los procesos anteriormente descritos son esenciales para la formación de los gametos de buena calidad, cualquier alteración de ellos por acción de algún agente externo podría alterar los procesos involucrados en la reproducción de los individuos.

1.5 Toxicología.

La palabra Toxicología desde el punto de vista etimológico deriva de dos palabras griegas: *toxikon* (veneno) y *logos* (tratado), que quiere decir “Ciencia de los venenos”. Hoy en día el concepto se ha modificado, ya que esta ciencia se extiende a un campo mucho más amplio, y actualmente podemos encontrar algunas definiciones más exactas como: “Ciencia centrada en el estudio, descripción y comprensión de las interrelaciones entre las sustancias químicas y los organismos, así como de sus efectos sobre los seres vivos” o “Ciencia que estudia los efectos nocivos originados por agentes químicos sobre los seres vivos, los mecanismos que dan lugar a tales perturbaciones, los medios y modos de contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar e identificar dichos agentes y valorar su toxicidad” (Bello *et al.*, 2001). En la actualidad la toxicología se define como la ciencia que se ocupa del estudio integral de las sustancias tóxicas, esto incluye el origen y propiedades, actividad tóxica y características de las intoxicaciones, relaciones entre estructura química y actividad tóxica, así como aspectos cualitativos y cuantitativos de la actividad tóxica. Entre los aspectos cualitativos se toman en cuenta la exposición al tóxico, (toxicocinética y toxicodinámica), la biotransformación del tóxico, sus consecuencias inmediatas y, las interacciones entre el tóxico y el receptor. Por otra parte, dentro de los aspectos cuantitativos de la actividad tóxica es importante: a) considerar si los efectos presentan un comportamiento relacionado con la dosis o relacionado con el tiempo de exposición (efectos agudos y efectos crónicos), b) establecer los umbrales sin efecto, suma de efectos, sinergismos, y c) encontrar selectividad de acción, terapia antitóxica y protección general ante la intoxicación (Bello *et al.*, 2001).

1.6 Toxicología reproductiva.

La toxicología reproductiva es la rama de la toxicología que estudia los efectos deletéreos producidos por xenobióticos en la reproducción, esto incluye el estudio de los trastornos sobre la fertilidad de los padres y sobre el desarrollo de los hijos (Repetto, 1997). Los xenobióticos pueden ser agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos y físicos (Bonilla *et al.*, 2001). Los trastornos tóxicos en la fertilidad abarcan efectos en la libido, comportamiento sexual, espermatogénesis, ovogénesis, actividad hormonal, el proceso de fertilización y el desarrollo del huevo fecundado hasta la fase de implantación (Caméan y Repetto, 2006).

1.7 Métodos de evaluación de toxicidad.

Actualmente los seres humanos estamos expuestos a un gran número de sustancias que se encuentran en productos de uso cotidiano como los conservadores de productos no perecederos, cosméticos, partículas en el aire, residuos de plaguicidas en los productos del campo, por mencionar algunos. Hasta el momento se tiene documentada la existencia de más de 89 millones de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas únicas, tales como aleaciones, compuestos de coordinación, minerales, mezclas, polímeros y sales, entre otros (CAS, 2014). Los organismos expuestos a dichas sustancias pueden presentar diferentes respuestas fisiológicas, respuestas que están en función de la solubilidad, biodisponibilidad y concentración del agente químico, así como del potencial tóxico, duración de la exposición y la sensibilidad del organismo (Connon *et al.*, 2012).

En la actualidad existen métodos que permiten evaluar el efecto de un tóxico en los organismos. Los estudios *in vivo* son modelos ampliamente utilizados observando directamente a los animales y a los humanos ocupacionalmente expuestos, además de éstos existen algunas alternativas a la experimentación con animales, estos son

los modelos *in vitro* en los cuales se aíslan tejidos o células en condiciones de laboratorio, se incuban y sirven para estudiar los mecanismos de acción de un determinado agente (Vinardell, 2007).

En general, los métodos que se aplican para la evaluación de toxicidad de una sustancia química se pueden clasificar en dos grandes grupos.

Primer grupo: ensayos para evaluar efectos globales en animales de experimentación. Dentro de este grupo se incluyen los siguientes tipos (Bello *et al.*, 2001)

- A) *Pruebas de toxicidad aguda:* esta prueba permite determinar parámetros toxicológicos como la dosis mínima mortal o las dosis letal 100 (DL₁₀₀) y la 50 (DL₅₀). El compuesto se administra una sola vez, con un periodo de observación generalmente bastante corto y los resultados sirven de punto de partida para fijar las dosis a utilizar en pruebas posteriores.
- B) *Ensayos de toxicidad prolongada o subcrónica:* la prueba abarca la décima parte del tiempo de vida del organismo. El compuesto se administra en varias dosis de forma regular o bien de manera irregular con la alimentación, el objetivo es evaluar el efecto de una posible acumulación del agente tóxico.
- C) *Estudios crónicos de toxicidad a largo plazo:* la prueba abarca al menos dos tercios de vida del animal y permite evaluar la forma de toxicidad, regularmente es acompañada por otras pruebas como la detección de una actividad cancerígena potencial.
- D) *Estudios bioquímicos:* esta prueba proporciona información sobre las transformaciones metabólicas y la identificación de metabolitos, esto contribuyen a explicar los mecanismos de toxicidad.

Segundo grupo: resulta como complemento del grupo anterior, ya que esos estudios no necesariamente son suficientes para evaluar el conjunto de efectos tóxicos derivados de la actividad biológica de una sustancia. Los estudios de este grupo responden a la necesidad surgida por los distintos usos que se hacen de algunos compuestos y pueden requerir la estimación de los márgenes de seguridad vinculados con su empleo.

- A) *Estudios de los efectos sobre las funciones de reproducción:* comprende los estudios sobre efectos embriotóxicos, no sólo dentro de una etapa fetal teratogénica, sino también en estadios anteriores y posteriores.
- B) *Estudios sobre potencialidades mutagénicas:* investiga la posible incidencia sobre el genoma.
- C) *Estudios sobre carcinogenicidad:* valora la capacidad de algunas sustancias para promover el desarrollo de tumores.
- D) *Estudios sobre comportamiento:* hacen referencia a posibles manifestaciones neurotóxicas propias de algunas sustancias.
- E) *Estudios inmunológicos:* ponen de manifiesto posibles alteraciones en el funcionamiento del sistema inmune.
- F) *Estudios sobre los efectos de potencialización:* son pruebas que ponen de manifiesto la potencialización de los efectos tóxicos de ciertas sustancias, cuando la ingestión de las mismas coincide con determinados estados fisiológicos de salud.

La finalidad de estas pruebas es la de obtener los criterios mínimos de seguridad para el manejo de los productos químicos. (Bello *et al.*, 2001).

1.8 Importancia del modelo porcino.

A principios del siglo XX se empezaron a desarrollar numerosos modelos experimentales, siendo el perro, la rata y ratón los más utilizados; a partir de entonces los modelos experimentales han contribuido enormemente al desarrollo de la ciencia. Hoy en día se pueden encontrar otros modelos de investigación como son los lagomorfos, primates y porcinos. El modelo porcino es ampliamente utilizado en investigación científica por ventajas crecimiento rápido y reproducción numerosa y por su anatomía y fisiología muy similares a las del ser humano (Medina *et al.*, 2008).

En los cerdos hembra la pubertad inicia cuando se presenta el primer ciclo estral y ocurre la primera ovulación, aproximadamente a los 7 meses de edad, con un peso alrededor de 77 kg. La ovulación inicia con el proceso del desarrollo folicular, y comprende un primer proceso de selección o reclutamiento de algunos folículos de la población total que se encuentra en el ovario y que potencialmente pueden ser ovulados, y un segundo proceso en el que se elige a aquellos folículos que culminarán con la ovulación (Williams *et al.*, 2010).

La especie porcina se caracteriza por tener un gran número de folículos ováricos en comparación con otras especies. Durante la fase lútea, se pueden observar de 30 a 90 folículos de 1 a 2 mm y de 30 a 50 de 2 a 7 mm de diámetro respectivamente. Durante la fase folicular, el número de folículos medianos y pequeños disminuye considerablemente, quedando aproximadamente 20 folículos, de los cuales la mayoría ovularán. Los folículos en los que se presentará la ovulación aumentan su desarrollo entre los 14 y 16 días del ciclo estral (Hafez *et al.*, 2002).

Los folículos ovulatorios son reclutados a partir de la reserva de los antrales que se desarrollan durante la fase lútea del ciclo, en la cual se observan folículos de aproximadamente 5 mm. Hacia el final de la fase lútea, los niveles de progesterona

descienden y los niveles crecientes de FSH y LH producen el reclutamiento de estos folículos. Los de tamaño pequeño no reaccionan ante este reclutamiento por no presentar suficientes receptores a FSH y LH, y por consiguiente, terminan en atresia. (Williams *et al.*, 2010). En la cerda en el primer estro se ovulan de 8 a 10 ovocitos, en el tercer estro de 12 a 24 ovocitos y en adultas de 17 a 44 ovocitos, siendo este un modelo adecuado para la colecta de ovocitos.

1.9 Daño al ADN.

El daño a nivel genético se define como la alteración, a distintos niveles, de la información contenida en el ADN. Este deterioro implica cambios o eliminación de bases nitrogenadas, incluyendo modificaciones en genes o grupos de genes, también puede implicar la pérdida de fragmentos de cromosomas (deleciones) o la eliminación de cromosomas completos (aneuploidias) o grupos de cromosomas en las células somáticas o germinales. Estas alteraciones, también llamadas mutaciones, provocan efectos importantes en los organismos. Cuando las mutaciones ocurren en las células germinales se relacionan principalmente con diversos trastornos durante el desarrollo fetal, los cuales derivan en defectos al nacimiento o en casos extremos muerte del embrión en diversas etapas del desarrollo. El efecto genotóxico en los organismos puede ser causado por la exposición a sustancias contaminantes. Las células eucariotas de manera natural pueden reparar algunos daños al ADN, mediante mecanismos entre los que se encuentran: la reparación de apareamientos incorrectos de bases nitrogenadas, reparación por escisión de base o de nucleótido, reparación de roturas bicatenarias y síntesis de ADN de translesión (Watson *et al.*, 2008). En las células donde no se repara el daño pueden ocurrir procesos como la senescencia y la apoptosis. Sin embargo si las células somáticas dañadas se siguen dividiendo, pueden ocurrir alteraciones en las funciones metabólicas o bien proliferación celular desmesurada y desordenada produciendo transformaciones malignas. Si el daño es irreversible y se

presenta en células germinales las alteraciones son heredadas a la siguiente generación y son causa de padecimientos genéticos (SEMARNAT, 2012).

1.10 Técnicas de evaluación de genotoxicidad.

Actualmente existen varias técnicas para medir el daño genético, entre las cuales se encuentran pruebas bioquímicas, moleculares, espectrofotométricas y pruebas citogenéticas, basadas en la sedimentación del ADN dañado. Sin embargo estas técnicas pueden ser costosas o poco sensibles. Las pruebas como el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis y el ensayo cometa son dos alternativas, ya que cada vez más se utilizan de manera cotidiana por su sencillez y excelentes resultados (SEMARNAT, 2012).

El ensayo cometa es considerado una técnica altamente sensible para evaluar el daño y la reparación del ADN en cualquier tipo celular eucariota. Esta técnica permite detectar rupturas de cadena simple y sitios sensibles al álcali que se originan durante la reparación por escisión de bases y de nucleótidos dando lugar a la formación de la cola del cometa constituida por los fragmentos de ADN dañados (Cossio *et al.*, 2004).

2. Antecedentes.

2.1 Compuestos perfluorados (PFCS).

Los PFCS son un grupo de productos químicos que no se encuentran naturalmente en el medio ambiente y se han utilizado desde la década de 1950. La estructura de estos productos químicos está constituida por una cadena de carbonos rodeados por átomos de flúor y un grupo ácido o amida situado en el extremo de la cadena de

carbonos. Son compuestos muy estables, hidrófobos y oleóforos (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades: ATSDR, 2009). Estas propiedades únicas han dado lugar a un uso amplio de los PFCS, por ejemplo: en formulaciones protectoras de cartón, alfombras y productos de cuero, en la industria textil como repelente de agua y grasa. Los PFCS se han utilizado también en las espumas contra incendios y en la producción de recubrimientos antiadherentes en utensilios de cocina y algunas prendas de vestir (DRAFT, 2011).

Los PFCS con mayor volumen de producción son el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Dentro de las mismas familias los compuestos con más alta producción son el sulfonato de perfluorohexano (PFHxS), un miembro de la misma clase química que PFOS, y el ácido perfluorononanoico (PFNA), que es un miembro de la misma clase química que PFOA. Sólo en EUA la producción reportada de PFOS y PFOA en 2002 fue de 15.000 y 500.000 libras respectivamente (DRAFT, 2011).

El PFOS tiene una fórmula molecular $C_8F_{17}SO_3$, comúnmente se encuentra como una sal de potasio; está constituido por una cadena carbonada totalmente fluorada, que se utiliza como una sal o se incorpora a polímeros más grandes. PFOS y sus compuestos más cercanos, son miembros de la gran familia de sustancias del sulfonato de perfluoroalquilo (PFAS). La persistencia en condiciones extremas de esta sustancia la hace adecuada para aplicaciones en utensilios que resisten alta temperatura y para aplicaciones en contacto con ácidos o bases fuertes. Los enlaces carbono-flúor son muy fuertes, lo que causa la persistencia de esta sustancia en el ambiente (ATSDR, 2009). Se descomponen muy lentamente en el aire y suelo; pueden pasar del suelo al agua subterránea y pueden transportarse a grandes distancias por las corrientes oceánicas hasta los lugares más remotos. Se han detectado niveles importantes de PFCS en lugares abiertos como el Atlántico Norte, en donde las concentraciones reportadas van de 130-650 pg/L. En el Mar de

Groenlandia, las concentraciones de PFCS oscilaron entre 45 y 280 pg/L (Zhao *et al.*, 2012).

En los últimos años se han incrementado los estudios en animales y humanos expuestos a los PFCS ya que existen evidencias sobre una acumulación de estos compuestos en los organismos (Cassone *et al.*, 2012). Los PFCS pueden ingresar al cuerpo a través de los pulmones cuando se respira aire que contiene estos compuestos, hay poca información sobre la velocidad, la cantidad y el PFCS que más entra por esta vía. Puede ingresar a través del tracto digestivo, mediante el consumo de alimentos o agua contaminada, o bien por la piel cuando se tiene contacto con polvos, aerosoles o líquidos. En la figura 1 se ilustran las posibles vías de absorción de algunos tóxicos. Es posible que cantidades pequeñas ingresen al cuerpo a través de la piel, una vez dentro del organismo, el PFOS se transporta unido a la albumina y se bioacumula en órganos como; hígado, riñón, por mencionar algunos (Governini *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2011). Los PFCS tienden a permanecer sin cambios durante largos periodos; en los humanos se reportan hasta 4 años para el descenso de las concentraciones en el plasma sanguíneo. En los EUA los PFCS encontrados en plasma sanguíneo en la mayoría de los ciudadanos son el PFOA y el PFOS (Shankar *et al.*, 2011). Las vías de eliminación de los PFCS son principalmente por la orina, también se ha observado que la leche materna puede ser otra vía de eliminación y a su vez puede contribuir a la exposición de los lactantes a los PFCS, ya que se han detectado concentraciones importantes de estos compuestos (Goosey *et al.*, 2012).

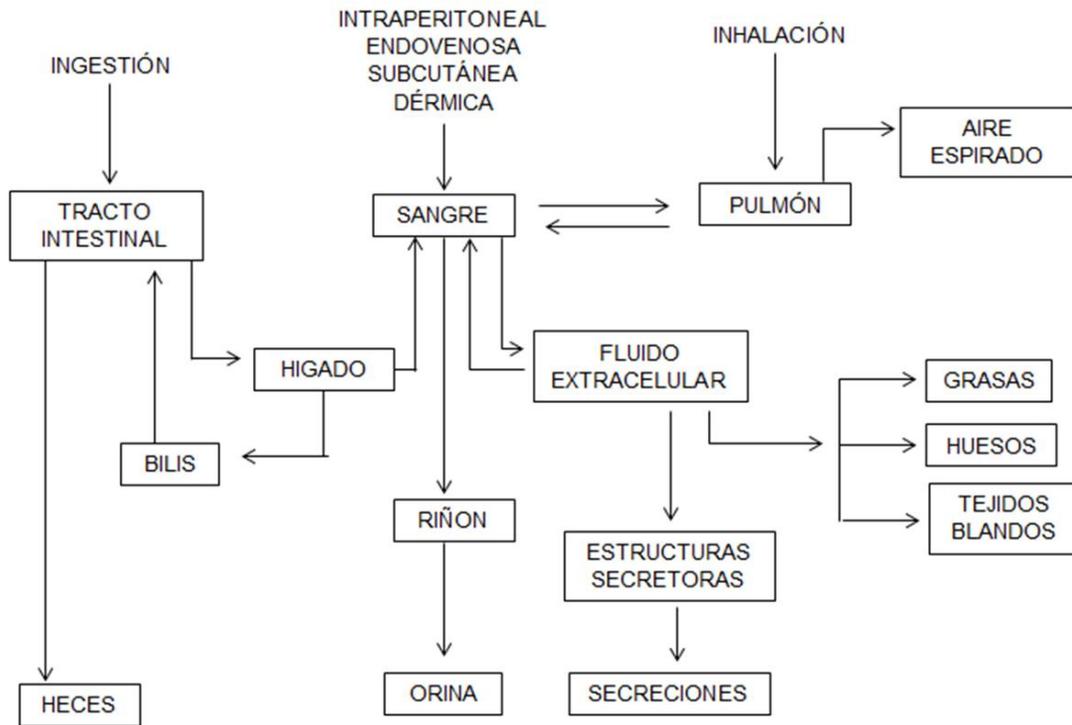


Figura 1. Posibles rutas de penetración de algunos compuestos tóxicos y su distribución en un organismo (Bello *et al.*, 2001).

Las altas concentraciones de PFCS encontradas en plasma de animales y humanos se han relacionado con diversos fenómenos que afectan a los individuos expuestos. En roedores estudios recientes han mostrado posibles efectos sobre el desarrollo, la reproducción, la neuroendocrinología y aparición de tumores en el hígado de rata (EPA, 2012). En los humanos las altas concentraciones de PFCS se han relacionado con diversos fenómenos adversos ya que la bioacumulación de PFOS puede alterar el metabolismo del colesterol o la homeostasis (Nelson *et al.*, 2010).

2.2 Efecto de los PFCS en la reproducción.

En mujeres, el PFOS, produce alteraciones en el ciclo menstrual (Fei *et al.*, 2009), y una disminución en la tasa de embarazos (Jacquet *et al.*, 2012). Governini *et al.*, (2011), reportaron la presencia de PFCS en fluido folicular con una concentración de aproximadamente 13 ng/mL (0.026 μ M), que disminuyó la tasa de fertilización.

En los hombres el PFOS se ha relacionado con problemas en la calidad de semen, como defectos en la morfología de los espermatozoides (Toft *et al.*, 2012), además de daños a la integridad del ADN (Joensen *et al.*, 2009).

Estudios realizados con embriones de hámster demostraron que los PFCS afectaron la morfología cuando las hembras fueron expuestas a éstos durante la gestación, observándose una disminución en la masa corporal al nacimiento (Jacquet *et al.*, 2012), y un descenso en el crecimiento de los órganos y el esqueleto de los fetos de roedores expuestos (Fei *et al.*, 2008).

3. Justificación.

El uso indiscriminado de los PFCS ha provocado una amplia distribución de estos compuestos en todo el mundo; hay reportes que indican que se pueden encontrar en mar abierto y bioacumularse en los organismos de vida libre y humanos.

En las mujeres la exposición a los PFCS se ha relacionado con abortos e infertilidad. La maduración de los ovocitos es un evento necesario para que se lleve a cabo la fertilización y el subsecuente desarrollo embrionario y cualquier alteración en este proceso podría interferir en la gestación, por lo que es de importancia determinar el efecto que estos compuestos puedan tener en la viabilidad y la maduración del COCs

Se ha observado que los PFCS dañan la integridad del ADN de los espermatozoides, por lo que es importante evaluar si estos compuestos inducen este tipo de efecto en los ovocitos y las CC.

4. Preguntas de investigación.

¿El PFOS afectará la viabilidad y la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos porcinos?

¿El PFOS tendrá efecto genotóxico en los ovocitos y las CC?

5. Hipótesis.

La exposición de los COCs al PFOS durante la MIV afectará la viabilidad, la maduración y provocará daño en el ADN en los ovocitos y las CC.

6. Objetivo general.

Evaluar el efecto del PFOS en la viabilidad, la maduración y la integridad del ADN de los ovocitos y las CC expuestos a este compuesto durante 44 h de MIV.

6.1 Objetivos particulares.

- Determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) en ovocitos y CC expuestos a PFOs durante la MIV.
- Determinar la concentración de inhibición de la maduración 50 (CIM₅₀) en ovocitos expuestos a PFOS durante la MIV.
- Evaluación de daño en el ADN en ovocitos y CC en concentraciones subletales.

7. Metodología.

Todos los compuestos empleados fueron de marca Sigma (St. Louis, MO), a menos que se indique otra diferente. La MIV de los COCs porcinos y los medios de cultivo se realizaron de acuerdo con el método de Abeydeera *et al.*, (1998).

7.1 Colecta de los Complejos Ovocitos-Células del Cúmulo (COCs).

Los ovarios se colectaron de cerdas prepúberes recién sacrificadas en el rastro (los Arcos, los Reyes, Edo. de México) y se transportaron en un tiempo no mayor a 2 h al laboratorio a una temperatura de 25 °C, en solución de Na Cl al 0.9% a un pH de 7.3 a 7.4. Una vez en el laboratorio se lavaron tres veces con la misma solución. Se puncionaron los folículos que midieron de 3 a 6 mm de diámetro (anexo 14.1 a), el fluido folicular se depositó en un tubo de 50 mL y se dejó sedimentar por 20 min para favorecer la formación del paquete celular. El sobrenadante se desechó y al paquete celular se le adicionaron 15 mL de medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio, HEPES (2.38 g/L) y PVA (0.29 g/L) (TL-HEPES-PVA) a un pH de 7.3 a 7.4 y se dejó sedimentar durante 15 minutos; este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente el paquete celular se depositó en una caja Petri de 90 mm de diámetro y se agregaron 20 mL del mismo medio.

Utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus SZ60, Olympus Optical, Japón) se aspiraron los COCs con una pipeta Pasteur de vidrio estéril, adelgazada de forma manual mediante la exposición a la flama de mechero, de tal manera que los COCs pasaran libremente a través del diámetro de ésta. Se tomaron únicamente los COCs constituidos por ovocitos con citoplasma uniforme y granular y rodeados por más de tres capas de CC (Anexo 14.1 b). La selección de los COCs se muestra en la figura 2.

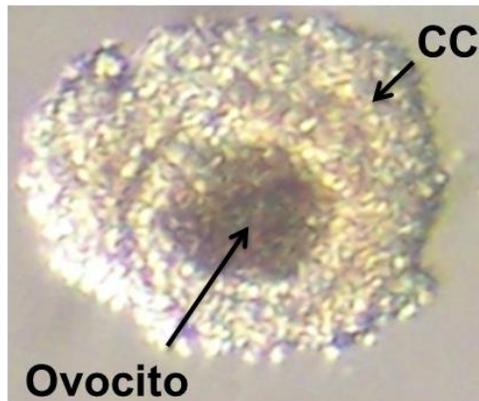


Figura 2. Imagen del COCs de buena calidad antes de la MIV. Los ovocitos presentan citoplasma con color uniforme y están rodeados de manera regular por más de tres capas de CC.

7.2 Maduración *in vitro* (MIV).

Los COCs seleccionados se lavaron 3 veces en 3 diferentes gotas de de 500 μ L de medio de maduración TCM-199 con sales de Earle, bicarbonato de Sodio (2.2 g/L) y rojo fenol (In vitro, México) suplementado con PVA al 0.1%, D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y 10 ng/mL de EGF (Wang y Niwa, 1995) cubiertas con aceite mineral en cajas Petri estériles de 35 mm de diámetro (Nunc, Dinamarca).

La MIV se llevó a cabo en una caja estéril de 4 pozos (Nunc, Dinamarca) en donde se depositaron 50 COCs por cada pozo en una gota de 500 μ L de medio de maduración adicionado con 0, 12.5, 25, 50, 100, 150 y 200 μ M de PFOs grado reactivo, antes de la incubación se agregaron 0.5 μ g/mL de FSH y LH a cada pozo. Los COCs se incubaron durante 44 h en una atmósfera a 38.5 °C con 5% de CO₂ y humedad a saturación (Ducolomb *et al.*, 2009; Casas *et al.*, 2010). Después de 44 h de maduración, bajo el microscopio estereoscópico (Olympus SZ60, Olympus Optical, Japón), se observó la expansión de las CC como un indicador indirecto de

maduración (Anexo 14.2 a). En la figura 3 se muestra la expansión de las CC después de 44 h de maduración.

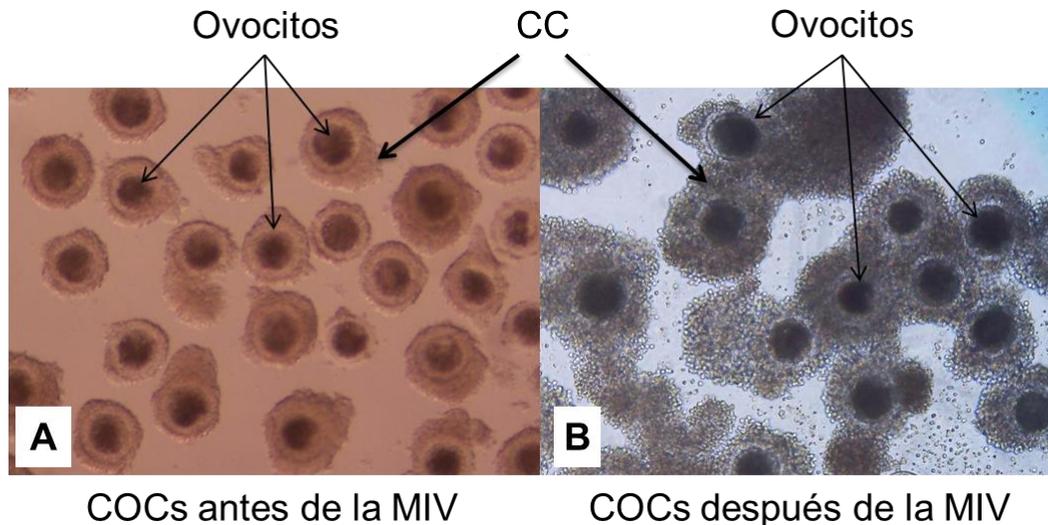


Figura 3. Expansión de las CC. En A antes de la maduración y en B después de 44 h de la MIV.

7.3 Evaluación de la viabilidad y maduración.

Después de las 44 h de iniciada la MIV, se realizó la denudación de los ovocitos desprendiendo las CC por acción mecánica, utilizando una micropipeta de 2-200 μ L. La viabilidad y la maduración para cada tipo celular se evaluaron de manera independiente. La evaluación de la viabilidad y la maduración se realizaron en el mismo ovocito mediante una técnica de doble tinción utilizando MTT para determinar la actividad mitocondrial en los ovocitos vivos y Bisbenzmid (Hoechst 33258) para determinar la etapa de maduración (Casas *et al.*, 2010), anexo 14.2 b.

Para evaluar la viabilidad los ovocitos se incubaron en 0.5 mg/mL de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) durante 90 min. Se lavaron y se incubaron posteriormente con 45 μ g/mL de Bisbenzamida (Hoechst 33258) por 45

min y finalmente se fijaron con una solución de glutaraldehído al 0.5 % (glutaraldehído/PBS) durante 20 min. Posteriormente se colocaron en portaobjetos y se les agregó una gota de solución de montaje glicerol/PBS (9:1). Las muestras se guardaron en un lugar oscuro dentro del refrigerador hasta el momento de la evaluación.

La viabilidad se analizó en microscopio de campo claro (OLYMPUS CX31) a 400 X, considerando a los ovocitos incoloros como muertos y a los de color púrpura como vivos (Figura 4). La evaluación de la MIV se realizó en un microscopio de Epifluorescencia (Zeiss Axiostar plus), $\lambda=460$ nm; los ovocitos se clasificaron con los siguientes criterios: vesícula germinal (VG): inmaduros; metafase I (MI): en vías de maduración; metafase II + cuerpo polar (MII): ovocitos maduros (Casas *et al.*, 2010). Los criterios de evaluación se muestran en la figura 5 y anexo 14.2 c.

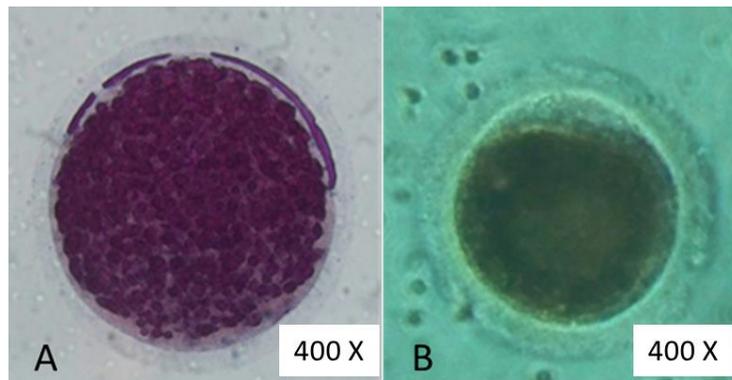


Figura 4: Tinción con MTT para evaluar la viabilidad de los ovocitos de cerdo. En A se muestra un ovocito vivo y en B un ovocito muerto.

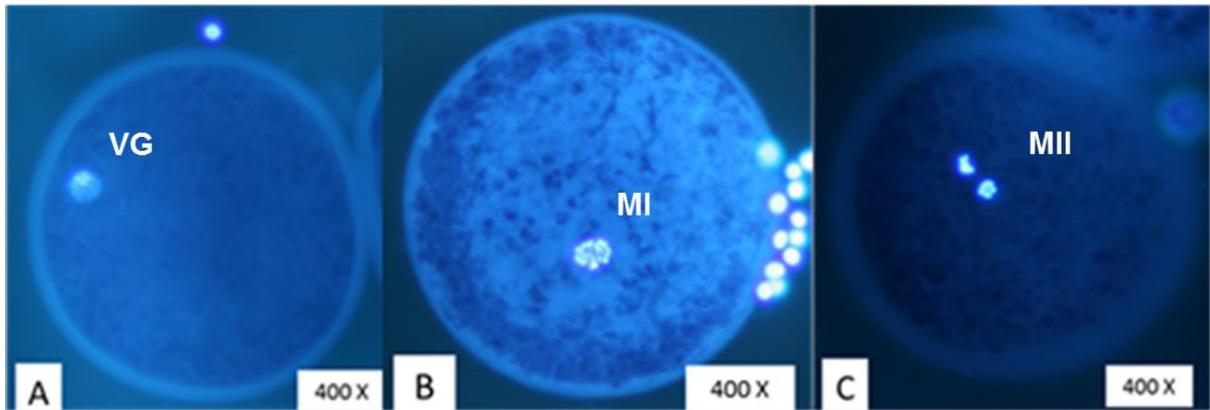


Figura 5. Ovocitos en diferentes etapas de maduración.

A: vesícula germinal (VG); B: ovocito madurando en metafase I (MI); C: ovocito madurado en metafase MII (MII).

La viabilidad de las CC, se cuantificó en los COCs completos mediante una tinción con azul tripano (ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4' diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfónico) al 0.5 % agregando el mismo volumen de colorante que en el que se encontraban las CC. Inmediatamente en microscopio de campo claro a (OLYMPUS 31) 400 X se evaluó el porcentaje de células teñidas considerando las azules como muertas y las incoloras como vivas. Los criterios de evaluación se muestran en la figura 6 y anexo 14.2 d.

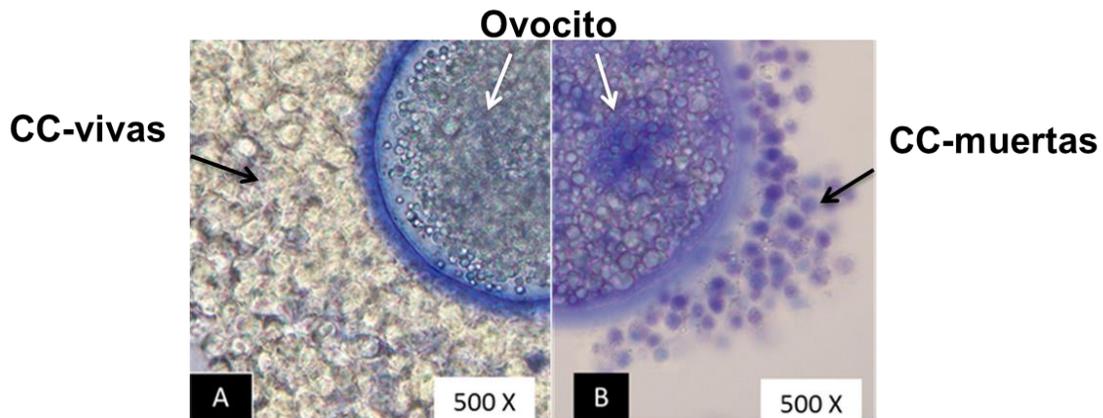


Figura 6. Criterios de evaluación de la viabilidad de las CC. En A las células incoloras se consideraron como vivas y en B las teñidas se consideraron como muertas.

7.4 Evaluación del daño al ADN.

Después de la MIV se separaron los ovocitos de las CC por la acción mecánica antes descrita. En el caso de los ovocitos, para la eliminación de la zona pelúcida, antes del ensayo cometa se transfirieron a gotas de 50 uL de una solución de pronasa al 1% (W:V) en PBS durante 30 a 40 seg, una vez que se observó al microscopio estereoscópico la disgregación de la zona pelúcida se lavaron tres veces en gotas de 500 uL de PBS.

7.4.1 Preparación de laminillas con ovocitos y CC para el ensayo cometa.

Los dos tipos celulares se transfirieron de manera independiente (50 ovocitos por tubo y el total de CC obtenidas) a tubos Eppendorf, el volumen se llevó con PBS (1X) a 500 μ L y se centrifugó a 6 000 rpm x 5 min en una microcentrífuga (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente se descartó el sobrenadante dejando sólo el paquete celular en 10 μ L de PBS (1X) y las muestras se conservaron a 4 °C.

Para su procesamiento tanto a los ovocitos como a las CC se les añadieron 75 μ L agarosa de bajo punto de fusión al 0.75% en PBS. El volumen total de la mezcla se colocó de forma homogénea sobre un portaobjeto previamente tratado con una capa de agarosa de punto de fusión normal (1% en PBS) y se cubrieron con un cubreobjetos. La muestra se colocó en una cama fría durante 10 min para solidificar más rápidamente la agarosa. Posteriormente se retiró el cubreobjetos y al portaobjetos se agregaron nuevamente 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión para evitar la pérdida de células durante la electroforesis, nuevamente se colocó un portaobjetos y se repitió la incubación en la cama fría por 10 min, transcurrido este tiempo se retiró el cubreobjetos y se procedió a realizar la lisis de las células (Tatemoto *et al.*, 2000).

7.4.2 Lisis de los ovocitos y CC.

Los pasos siguientes se realizaron bajo luz amarilla para impedir el daño adicional al ADN. La lisis de los ovocitos y de las CC se realizó por separado. A cada muestra se le añadió una solución compuesta por NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 0.16 M, Triton X-100 0.016 mM, a un pH de 10, al menos por 24 h. Posteriormente los portaobjetos se equilibraron dentro de la cámara de electroforesis horizontal (BIO RAD, México) durante 15 min en una solución amortiguadora alcalina (NaOH 0.3 M, EDTA 1 mM, a pH >13), para provocar la desnaturalización del ADN. Al término de este paso se prosiguió con la electroforesis (Novotná *et al.*, 2009).

7.4.3 Electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa).

La electroforesis se realizó en una cámara horizontal (BIO RAD, México) con un amortiguador alcalino a $\text{pH} > 13$, con un voltaje de 25 V/cm y 300 mA durante 15 min. Posteriormente los portaobjetos se transfirieron a un vaso de Coplin con una solución de Tris 0.4 M ($\text{pH} 7.5$) por 5 min; este paso se realizó dos veces. Posteriormente las laminillas se deshidrataron en una solución de alcohol etílico frío al 96% por 10 min (deshidratación de las preparaciones) y se guardaron hasta el momento de realizar la evaluación.

La tinción del ADN se realizó aplicando 45 μL de red gel al 0.005 % a las laminillas, dejándolas rehidratar en una cámara húmeda por 10 min.

La evaluación de las muestras se realizó en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axiostar plus) a una longitud de onda de (264-366 nm) (Urrego *et al.*, 2005; Novotná *et al.*, 2009). Los parámetros de genotoxicidad que se evaluaron utilizando el software llamado "Cromagen" (ODP, México) fueron la longitud y el porcentaje de ADN de la cauda, tomando como referencia el área total del cometa (100%) como se muestra en la figura 7.

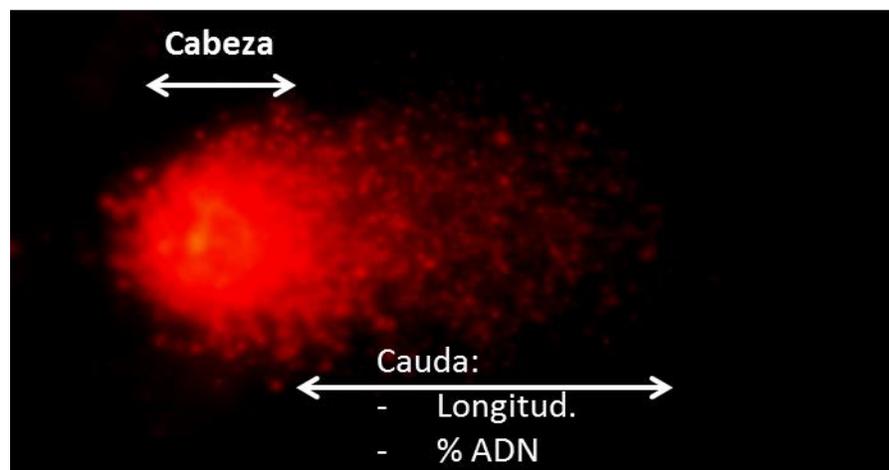


Figura 7. Parámetros evaluados en el ensayo cometa en CC.

El tamaño del cometa (100% de ADN) se toma como referencia para calcular el porcentaje de ADN contenido en la cauda y el grado de fragmentación da como resultado la longitud de la cauda.

7.5 Tratamiento con PFOS.

Para evaluar el efecto de PFOS en la maduración, viabilidad e integridad del ADN en los ovocitos y CC se utilizó el PFOS grado reactivo (heptadecafluorooctanesulfonic acid potassium salt. Sigma Número de catálogo 77282-10G).

Se preparó una solución patrón 20 mM de PFOS (utilizando como diluyente DMSO puro), a partir de la cual se preparó una solución de trabajo 2 mM (utilizando como diluyente TCM-199 suplementado), a partir de la última se obtuvieron las concentraciones finales para cada tratamiento. Para evaluar el efecto del diluyente se realizaron experimentos independientes utilizando el porcentaje de DMSO correspondiente al que estaba presente en cada una de las concentraciones del PFOS.

Para la evaluación del daño al ADN por el PFOS en los ovocitos y CC se utilizó una concentración subletal correspondiente a 23 μM (1/4 de la CL_{50} observada en las CC). Para el análisis de la integridad del ADN se incluyó un control positivo de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 200 μM . Las concentraciones de PFOS y los porcentajes de DMSO utilizados se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Concentraciones de PFOS y porcentajes de DMSO utilizadas en cada tratamiento.

Tratamientos	
Concentraciones (μM) de PFOS por cada tratamiento	Porcentajes (%) de DMSO (diluyente) por cada tratamiento
0 (Control)	0 (Control)
12.5	0.06
25	0.125
50	0.25
100	0.5
150	1

8. Análisis estadístico

Para la evaluación cuantitativa de cada uno de los parámetros (maduración, viabilidad e integridad del ADN) se realizó un análisis estadístico de comparación múltiple de Tukey-Kramer y una correlación de Spearman. Además se realizó una prueba de Ji-cuadrada (X^2) para comparar los porcentajes de células con daño en el ADN. Cada tratamiento se realizó al menos por triplicado con un nivel de confianza $p < 0.05$.

También se realizó la prueba estadística cuantil PROBIT que se caracteriza por la respuesta a un estímulo de n unidades experimentales, donde r unidades responden y $(n - r)$ no lo hacen.

9. Resultados.

9.1 Efecto del diluyente (DMSO) sobre la viabilidad de los ovocitos.

Para probar el posible efecto del diluyente en la viabilidad de los ovocitos se realizaron 5 experimentos en los cuales se utilizaron un total de 335 ovocitos con un promedio de 84 ovocitos por cada tratamiento. En la figura 8 se muestra la viabilidad de los distintos tratamientos de DMSO y el grupo control, al comparar los grupos la prueba estadística de Tukey-Kramer no muestra diferencias significativas. En la figura 9 y cuadro 2 se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada experimento. Para cada tratamiento sólo se consideró el valor de la mediana para la prueba estadística.

Cuadro 2. Porcentajes de viabilidad de los ovocitos en presencia de DMSO (diluyente) durante la MIV.

Porcentaje de DMSO				
0 (Control)	0.06	0.125	0.250	
Ovocitos vivos/ Total (%)				
7/7	5/5	6/7	6/6	
(100)	(100)	(86)	(100)	
6/8	7/7	6/6	7/7	
(75)	(100)	(100)	(100)	
6/6	6/6	6/6	7/7	
(100)	(100)	(100)	(100)	
27/28	24/25	17/19	28/30	
(96)	(96)	(89)	(93)	
37/38	41/43	33/35	35/39	
(97)	(95)	(94)	(90)	
97 %	100 %	94 %	100 %	Mediana

Con 5 experimentos por tratamiento y 84 ovocitos evaluados en cada tratamiento

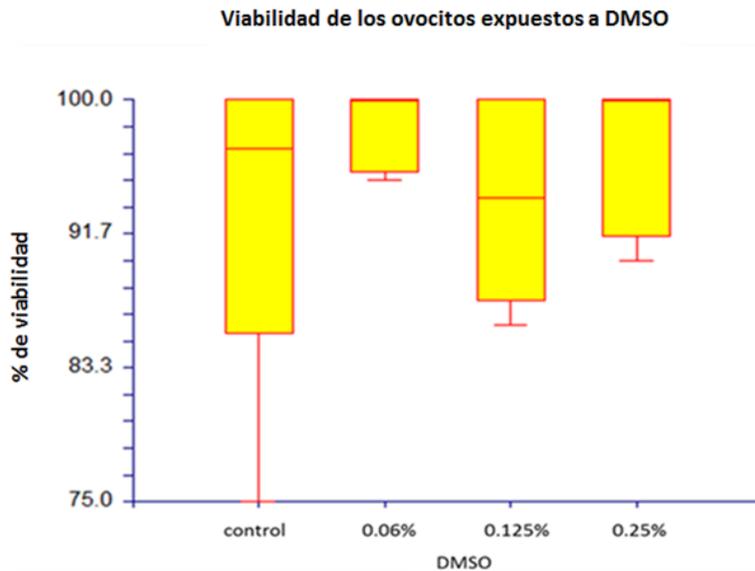


Figura 8. Porcentajes de viabilidad con distintos tratamientos con DMSO

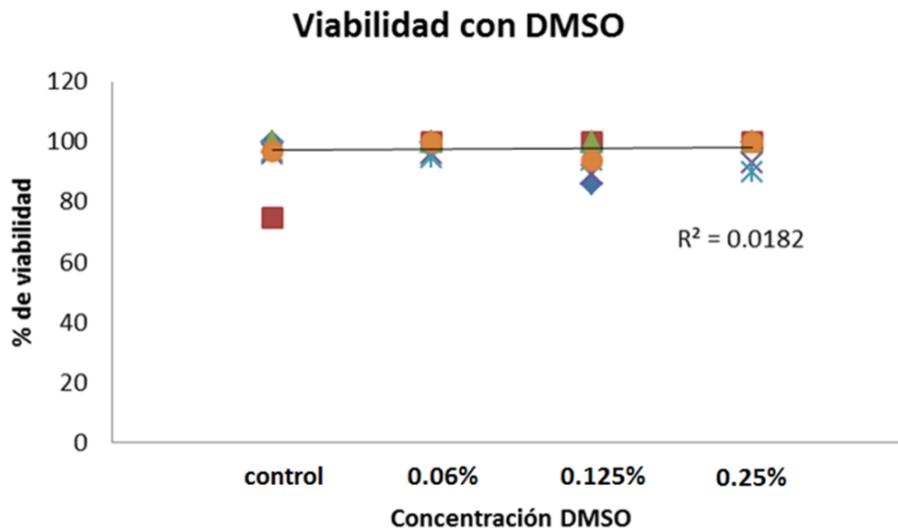


Figura 9. Porcentajes de viabilidad en ovocitos madurados en presencia de distintas concentraciones de DMSO (los datos no muestran correlación).

9.2 Efecto del PFOS sobre la viabilidad en los ovocitos.

Las concentraciones empleadas inicialmente fueron de 0, 12.5, 25, 50, 100, 150, 300, 500 y 1000 μM . Los resultados en la viabilidad de los ovocitos, evaluado después de las 44 h de MIV mostraron disminución dependiente de la concentración, además la viabilidad se abatió totalmente cuando se utilizaron altas concentraciones de PFOS (50, 100, 150, 300, 500 y 1000 μM). Por lo que para obtener la concentración letal 50 (CL_{50}) se incluyeron concentraciones menores a 50 μM , estos datos se muestran en la figura 10.

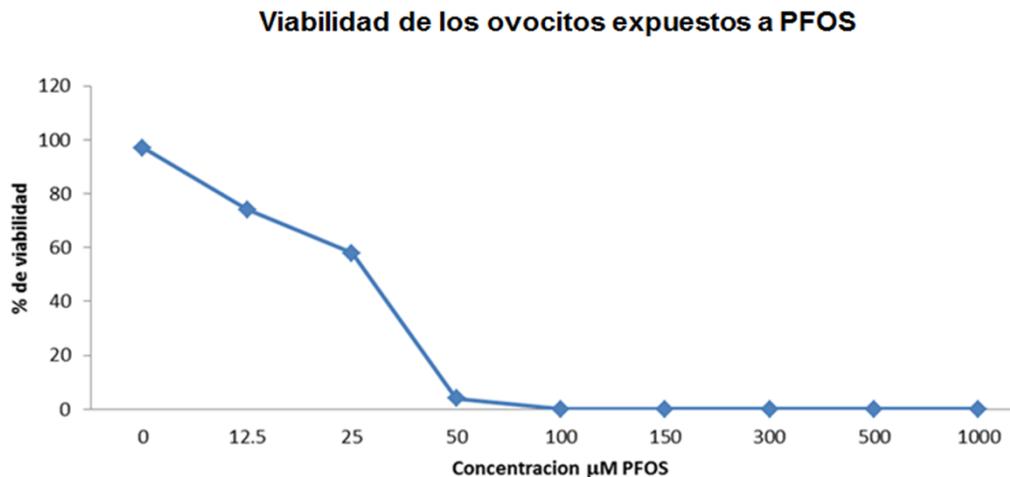


Figura 10. Viabilidad de los ovocitos expuestos a distintas concentraciones de PFOS durante la MIV.

Se realizaron 10 experimentos utilizando un total de 1,310 ovocitos, en promedio 328 ovocitos por cada tratamiento. Los datos obtenidos en viabilidad presentaron correlación negativa con respecto a las concentraciones probadas. Las concentraciones de 12.5 y 25 μM no afectaron considerablemente la viabilidad de los ovocitos. La prueba estadística de Tukey-Kramer mostró una diferencia significativa entre el grupo control y la concentración de 50 μM ($P < 0.05$) (figura 11). Los

porcentajes se muestran en el cuadro 3 y la figura 12 muestra la correlación entre la viabilidad y la concentración ($R^2 = 0.8095$). Con estos resultados se calculó la concentración letal 50 (CL_{50}) en 31 μM de PFOS (Cuadro 4). La CL_{50} que mostró PROBIT fue de 26.1 μM .

Cuadro 3. Porcentajes de viabilidad de los ovocitos expuestos a PFOS durante la MIV.

Concentración de PFOS (μM)				
Control	12.5	25	50	
Ovocitos vivos/Total				
(%)				
8/8	7/7	0/6	0/5	
(100)	(100)	(0)	(0)	
6/7	2/7	6/7	6/8	
(86)	(29)	(86)	(75)	
5/5	6/6	5/5	0/5	
(100)	(100)	(100)	(0)	
34/38	26/30	33/40	35/41	
(89)	(87)	(83)	(85)	
39/40	41/43	42/44	3/43	
(98)	(95)	(95)	(7)	
37/37	39/41	35/38	3/40	
(100)	(95)	(92)	(8)	
27/35	33/42	30/41	2/42	
(77)	(79)	(75)	(4)	
36/42	28/29	25/38	0/38	
(86)	(97)	(66)	(0)	
31/32	32/33	25/31	1/34	
(97)	(97)	(81)	(3)	
28/33	34/43	28/32	1/35	
(85)	(79)	(88)	(3)	
36/41	38/45	25/44	1/49	
(88)	(84)	(57)	(2)	
89 %	95 %	83 %	3 % *	Mediana

Con 11 experimentos por tratamiento y 328 ovocitos evaluados en cada tratamiento (*P<0.05).

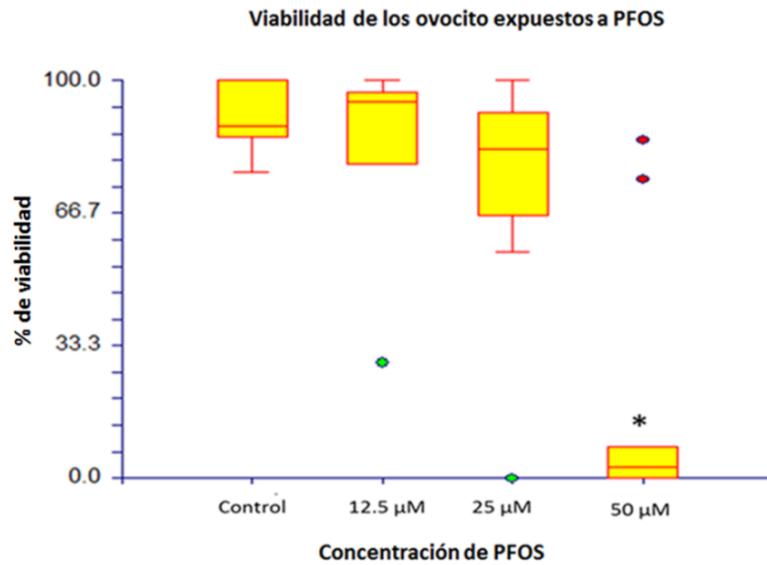


Figura 11. Viabilidad de los ovocitos expuestos a distintas concentraciones de PFOS.
*. Diferencia significativa ($P < 0.05$)

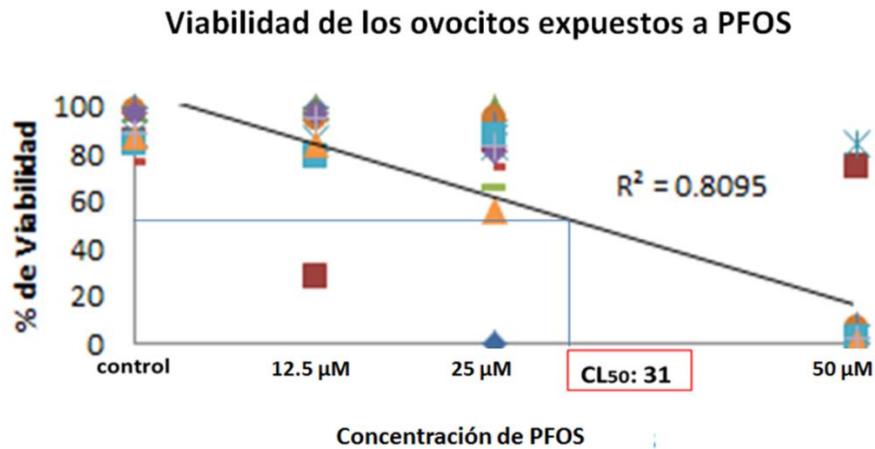


Figura 12. Viabilidad de los ovocitos expuestos a distintas concentraciones de PFOS durante la MIV. Se muestra una correlación negativa en relación a las concentraciones probadas.

Cuadro 4. CL_{50} de los ovocitos calculada mediante la prueba estadística de Probit.

Percentil	Probit	Log(Dosis)	Error Est. Log(Dosis)	Dosis	Error Est. Dosis
1	2.6737	2.0578	0.0392	114.2267	10.3075
5	3.3551	1.8700	0.0301	74.1361	5.1318
10	3.7184	1.7699	0.0256	58.8773	3.4728
20	4.1584	1.6488	0.0210	44.5406	2.1506
25	4.3255	1.6027	0.0195	40.0603	1.8014
30	4.4756	1.5614	0.0184	36.4224	1.5468
40	4.7467	1.4867	0.0171	30.6689	1.2082
50	5.0000	1.4169	0.0167	26.1160	1.0056
60	5.2533	1.3471	0.0172	22.2390	0.8822
70	5.5244	1.2724	0.0187	18.7260	0.8051
75	5.6745	1.2311	0.0198	17.0254	0.7764

La CL_{50} calculada es 26 μ M (N= 11 experimentos)

9.3 Efecto del diluyente (DMSO) en la maduración de los ovocitos.

Para evaluar el posible efecto del diluyente DMSO en la maduración de los ovocitos se realizaron 6 experimentos con un total de 467 ovocitos, 117 por cada tratamiento con los porcentajes del diluyente indicados anteriormente.

Los resultados obtenidos mostraron que el diluyente no tuvo efecto sobre la maduración con respecto al grupo control (Cuadro 5). La prueba estadística de Tukey-Kramer no mostró diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de DMSO utilizadas para cada tratamiento y el grupo control (Figura 13). En la figura 14 se muestran el cálculo de la correlación entre el porcentaje MIV y la concentración de DMSO.

Cuadro 5. Porcentajes de MIV de los ovocitos en presencia de DMSO (diluyente).

Efecto del DMSO en la MIV de los ovocitos				
0 % (Control)	0.06 %	0.125 %	0.25 %	
(Ovocitos madurados/total)				
				%
12/19	12/21	4/15	3/21	
(63)	(57)	(27)	(14)	
15/27	10/17	13/17	10/16	
(56)	(59)	(76)	(63)	
10/18	20/23	14/20	9/15	
(56)	(87)	(70)	(60)	
9/17	7/17	12/20	11/19	
(53)	(41)	(60)	(58)	
11/14	13/16	7/15	10/14	
(79)	(81)	(47)	(72)	
15/20	19/30	18/28	16/28	
(75)	(63)	(64)	(57)	
56 %	63 %	64 %	63 %	Mediana

Con 6 experimentos por tratamiento y 117 ovocitos evaluados en cada tratamiento.

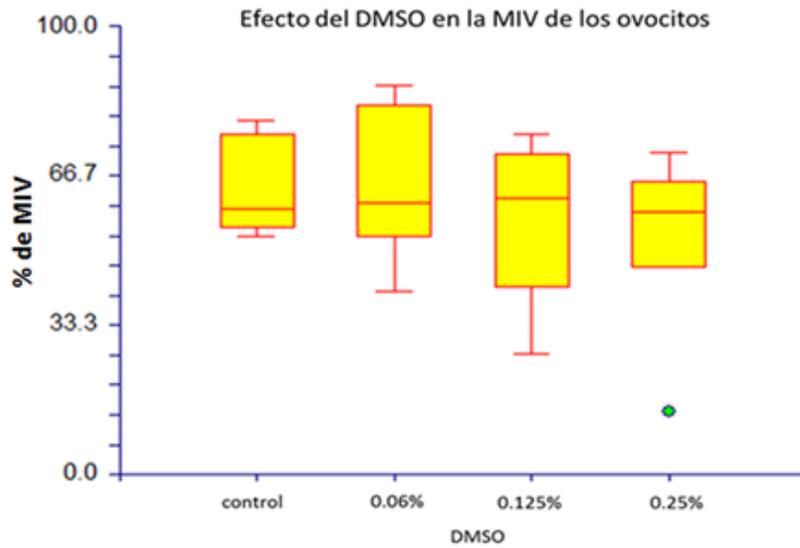


Figura 13. Maduración de los ovocitos en las distintas concentraciones de DMSO con respecto al grupo control.

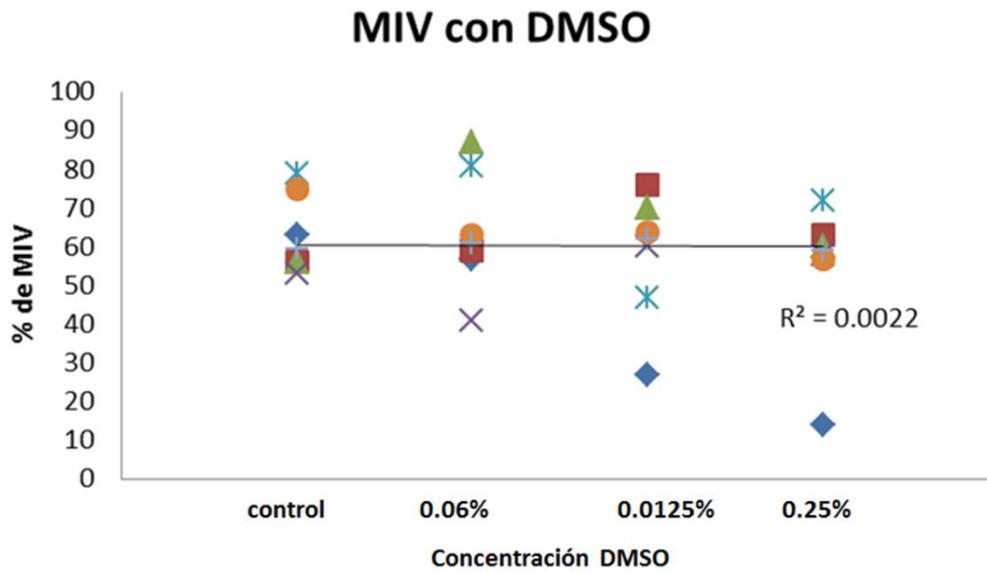


Figura 14. Porcentajes de MIV de los ovocitos en diferentes concentraciones de DMSO. (los datos no muestran correlación o los datos no están correlacionados).

9.4 Efecto del PFOS en la MIV.

Para evaluar el efecto del PFOS en la MIV se realizaron 9 experimentos, 196 ovocitos por cada tratamiento con un total de 784 (Cuadro 6). La prueba estadística de Tukey-Kramer mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las concentraciones de 25 y 50 μM con respecto al grupo control (Figura 15). Los porcentajes de maduración muestran una correlación negativa dependiente de la concentración. La regresión lineal indica que la CIM_{50} es de 11 μM (Figura 16), mientras que la prueba estadística PROBIT lo marca con un valor de 12.35 μM (Cuadro 7).

Cuadro 6. Porcentajes MIV de ovocitos expuestos a diferentes concentraciones de PFOS.

Maduración con diferentes concentraciones de PFOS				
Control (0 µM)	12.5 µM	25 µM	50 µM	
Ovocitos en MII/totales (%)				
19/24 (79)	15/22 (68)	0/13 (0)	1/17 (6)	
16/21 (76)	9/20 (45)	0/15 (0)	1/19 (5)	
13/23 (56)	10/17 (59)	0/20 (0)	2/19 (10)	
11/15 (73)	2/13 (15)	0/13 (0)	0/9 (0)	
10/14 (71)	0/15 (0)	1/21 (5)	0/25 (0)	
10/26 (38)	23/34 (68)	7/28 (25)	0/34 (0)	
11/27 (41)	14/27 (52)	6/28 (21)	0/26 (0)	
16/25 (64)	8/21 (38)	10/26 (38)	0/27 (0)	
15/23 (65)	13/23 (57)	6/23 (26)	0/31 (0)	
65 %	52 %	5 % *	0 % *	Medianas

Con 9 experimentos por tratamiento y 196 ovocitos evaluados en cada tratamiento (*P<0.05).

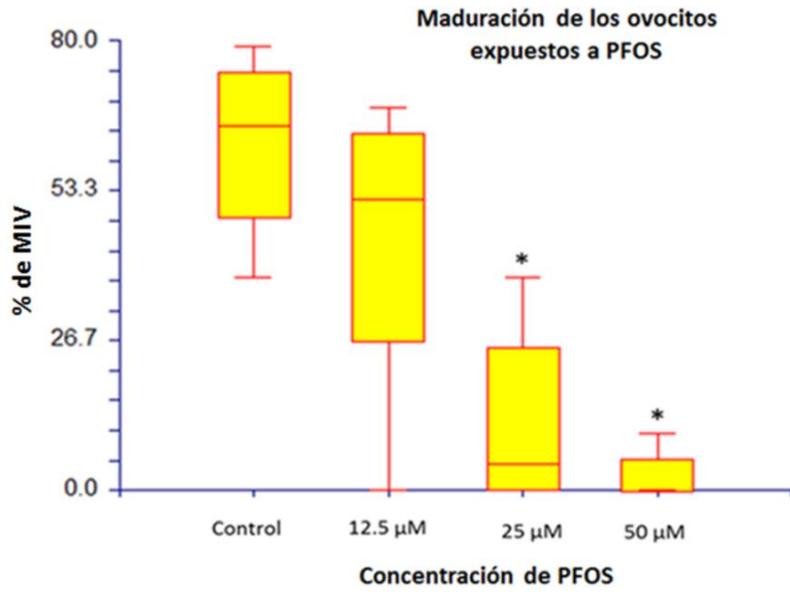


Figura 15. Efecto del PFOS sobre la MIV. (*P < 0.05).

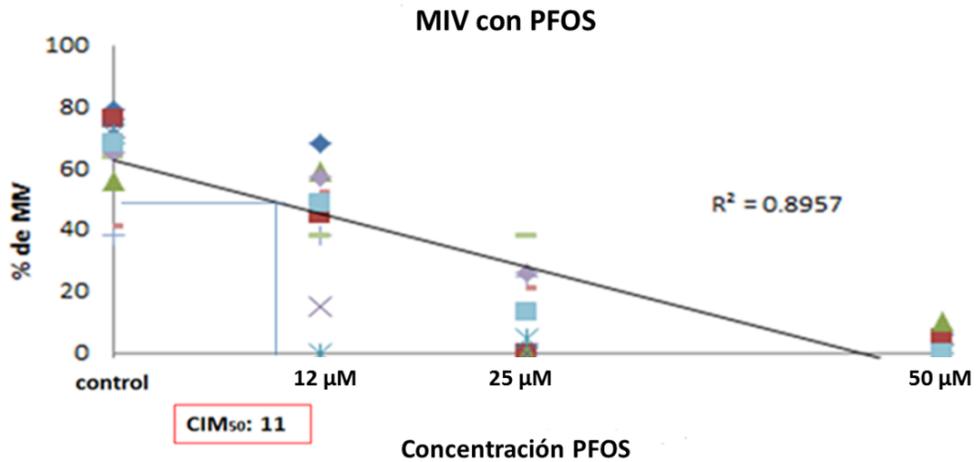


Figura 16. Porcentajes de maduración de los ovocitos expuestos a PFOS durante la MIV, donde se aprecia correlación negativa entre ambos parámetros.

Cuadro 7. CIM₅₀ calculada mediante la prueba estadística de Probit.

Percentil	Probit	Log(Dosis)	Error Est. Log(Dosis)	Dosis	Error Est. Dosis
1	2.6737	1.7900	0.0535	61.6574	7.6005
5	3.3551	1.5855	0.0360	38.5000	3.1958
10	3.7184	1.4764	0.0279	29.9522	1.9251
20	4.1584	1.3444	0.0210	22.1004	1.0697
25	4.3255	1.2942	0.0199	19.6899	0.9043
30	4.4756	1.2492	0.0199	17.7500	0.8152
40	4.7467	1.1679	0.0222	14.7181	0.7519
50	5.0000	1.0918	0.0263	12.3544	0.7476
60	5.2533	1.0158	0.0316	10.3702	0.7534
70	5.5244	0.9344	0.0379	8.5989	0.75124
75	5.6745	0.8894	0.0417	7.7517	0.7441
80	5.8416	0.8392	0.0460	6.9062	0.7311
90	6.2816	0.7072	0.0577	5.0958	0.6766
95	6.6449	0.5982	0.0676	3.9644	0.6169
99	7.3263	0.3937	0.0865	2.4755	0.4932

El programa estadístico muestra que la CIM₅₀ se encuentra en los 12.35 µM (N=9 experimentos).

9.5 Efecto del diluyente (DMSO) en la viabilidad de las CC.

Para descartar un posible efecto del diluyente sobre la viabilidad de las CC se evaluó la concentración más alta de DMSO que correspondió al 1% en el medio de cultivo. Los porcentajes de viabilidad entre el control y el DMSO fueron muy similares con valores de 94% contra 95% respectivamente, (Figura 17). Estos datos indican que el diluyente no afectó la viabilidad de las CC y se descarta un posible efecto en el parámetro evaluado.

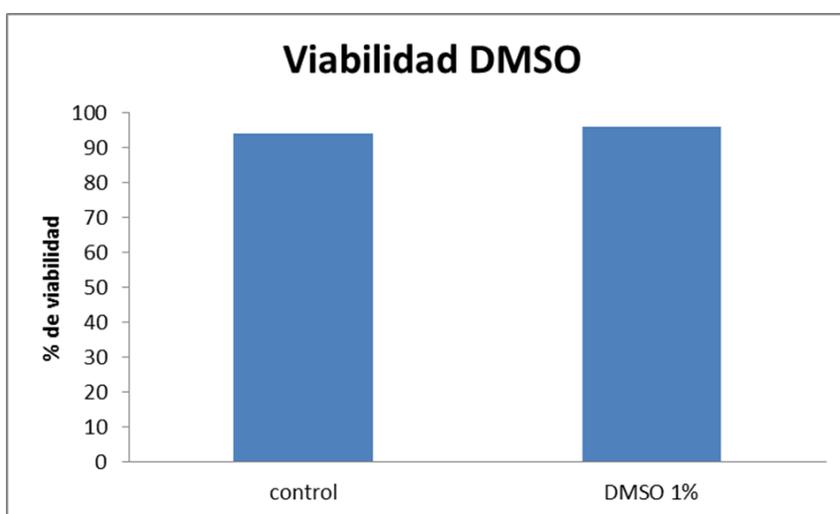


Figura 17. Porcentajes de viabilidad en CC expuestas a 1% de DMSO durante 44 h de MIV.

9.6 Efecto del PFOS en la viabilidad de las CC.

Debido a que las concentraciones de PFOS empleadas en la evaluación de la viabilidad de los ovocitos no afectaron la viabilidad de las CC se aumentaron las concentraciones del perfluorado a 100,150 y 200 μM ; y del diluyente hasta 1% (Cuadro 8).

Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. Los resultados se muestran en el cuadro 9. La prueba estadística de Tukey-Kramer revela disminución significativa de la viabilidad en 100 μM con una caída de hasta el 0% de células viables en la concentración 150 μM ($P < 0.05$; Figura 18). Los porcentajes de viabilidad de las CC presentaron una correlación negativa, con un comportamiento dependiente de la concentración y una CL_{50} de 90 μM (Figura 19). Por otro lado, la prueba estadística de PROBIT muestra que la CL_{50} se encuentra en 80.44 μM (Cuadro 10).

Cuadro 8. Concentraciones de PFOS y de DMSO utilizadas.

	0 μM	12.5 μM	25 μM	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM
PFOS	0 μM	12.5 μM	25 μM	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM
DMSO	0%	0.06%	0.12%	0.25%	0.50%	0.75%	1%

Cuadro 9. Porcentajes de viabilidad de las CC expuestas a diferentes concentraciones de PFOS

Porcentajes de viabilidad de las CC expuestas a PFOS						
Control	12.5 µM	25 µM	50 µM	100 µM	150 µM	
CC vivas /Total						
(%)						
48/51	48/50	42/50	40/50	25/50	0/50	
(95)	(95)	(85)	(80)	(50)	(0)	
47/50	48/52	48/50	45/50	33/50	0/51	
(94)	(95)	(95)	(90)	(65)	(0)	
49/50	49/50	49/50	46/51	25/50	0/50	
(98)	(97)	(97)	(90)	(50)	(0)	
95 %	95 %	95 %	90 %	50 %*	0 %*	Mediana

Con 3 experimentos por tratamiento y 150 ovocitos evaluados en cada tratamiento (*P<0.05).

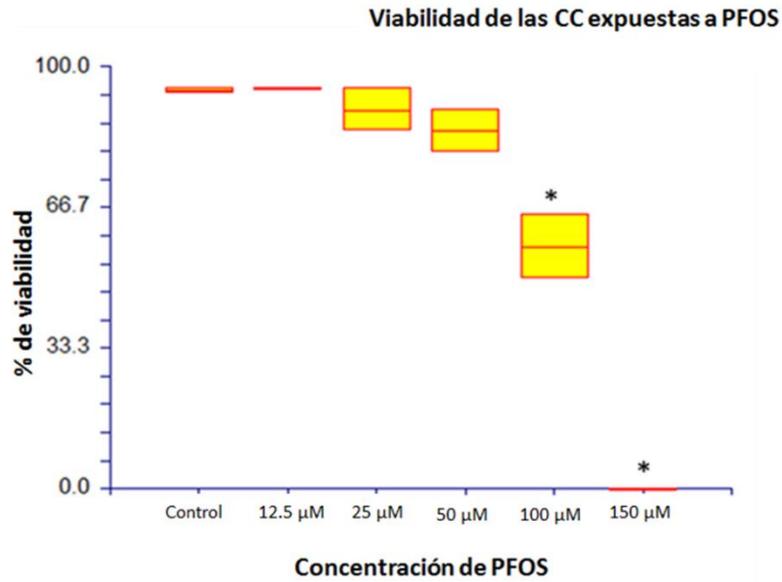


Figura 18. Porcentajes de viabilidad correspondientes a distintas concentraciones de PFOS (*P < 0.05).

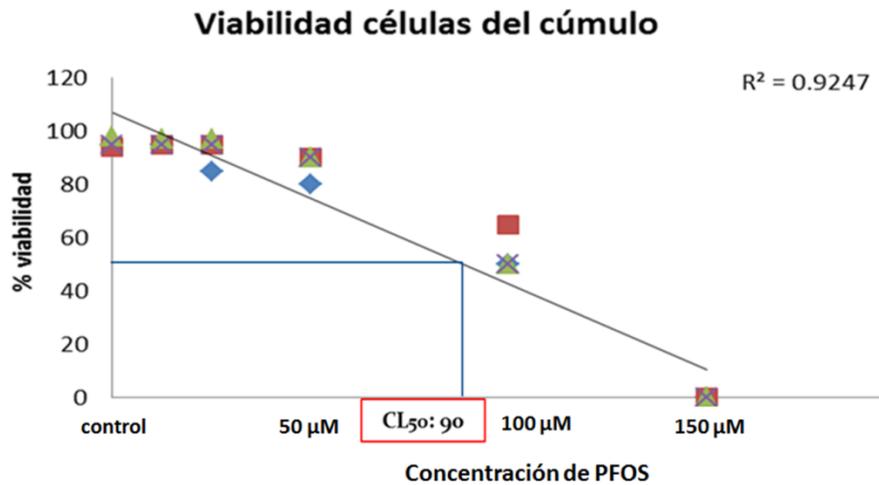


Figura 19. Porcentajes de viabilidad de las CC expuestas a PFOS durante 44 h de MIV. La concentración 200 μM no se muestra debido a que la viabilidad se abatió totalmente en 150 μM

Cuadro 10. CL_{50} para las CC calculada mediante la prueba estadística de Probit.

Percentil	Probit	Log(Dosis)	Error Est. Log(Dosis)	Dosis	Error Est. Dosis
1	2.6737	1.1806	0.0492	15.1575	1.7164
5	3.3551	1.3930	0.0365	24.7159	2.0765
10	3.7184	1.5062	0.0302	32.0758	2.2331
20	4.1584	1.6433	0.0237	43.9800	2.3969
25	4.3255	1.6953	0.0217	49.5829	2.4728
30	4.4756	1.7421	0.0202	55.2202	2.5672
40	4.7467	1.8266	0.0186	67.0743	2.8709
50	5.0000	1.9055	0.0186	80.4445	3.4368
60	5.2533	1.9844	0.0199	96.4799	4.4315
70	5.5244	2.0689	0.0227	117.1911	6.1303
75	5.6745	2.1157	0.0247	130.5152	7.4137
80	5.8416	2.1677	0.0271	147.1424	9.1806
90	6.2816	2.3048	0.0343	201.7511	15.9525
95	6.6449	2.4180	0.0409	261.8288	24.6483
99	7.3263	2.6304	0.0538	426.9378	52.9347

El programa estadístico muestra que la CL_{50} se encuentra en 80.44 μ M (N=3 experimentos).

9.7 Efecto del PFOS sobre el ADN después de la MIV mediante la prueba de cometa.

9.7.1 Daño al ADN en las CC.

Para la evaluación del daño al ADN en las CC se evaluaron 150 cometas para cada tratamiento: PFOS 0 μM (control negativo); PFOS 23 μM ; DMSO 0.06% y H_2O_2 200 μM (control positivo). Se compararon tres parámetros de daño al ADN. El primero, evaluado al microscopio de epifluorescencia a 400 X, fue el número de células con daño. Las células se clasificaron sin daño cuando las caudas tuvieron un diámetro menor o igual a la longitud de la cabeza y con daño cuando éstas presentaron un diámetro mayor al de la cabeza. El segundo y tercer parámetros se evaluaron mediante el programa computarizado Cromagen. En el segundo se determinó la longitud de las caudas de los cometas y en el tercero, el porcentaje de ADN en las caudas (Figura 21 y 22 respectivamente).

El grupo tratado con PFOS, tuvo un mayor porcentaje de células con daño respecto al control 61 y 34.5% respectivamente (Figura 20). En el grupo del control positivo tratado con H_2O_2 , todas las células presentaron daño; mientras que el grupo tratado con DMSO presentó un porcentaje de células dañadas similar al grupo control. La prueba estadística de χ^2 para dos muestras independientes mostró diferencia significativa tanto del grupo tratado con PFOS como del tratado con H_2O_2 , al compararse con el grupo control. El DMSO no presentó diferencia significativa respecto al grupo control. Los resultados se muestran en la figura 20.

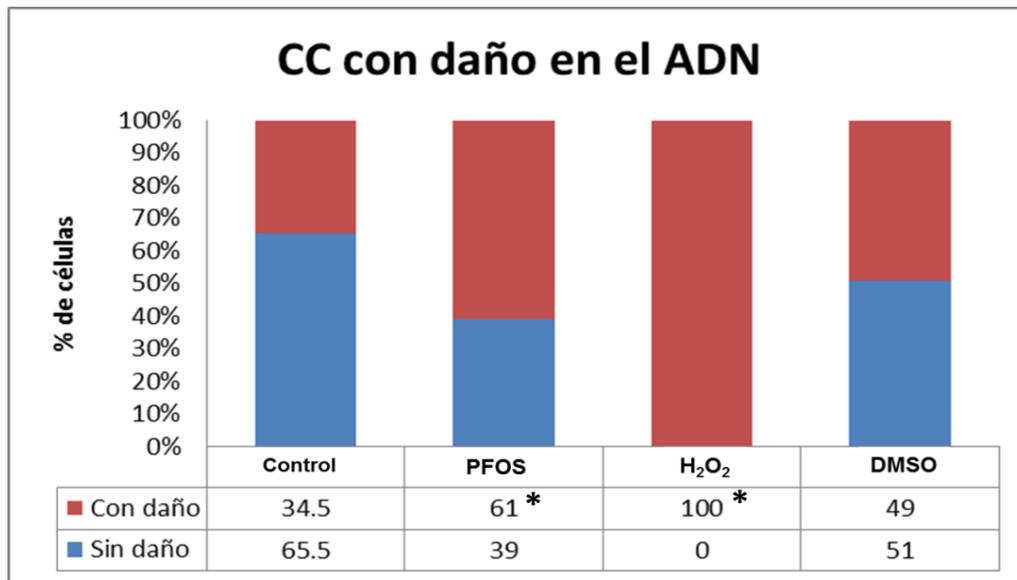


Figura 20. Porcentajes de células que presentaron daño al ADN por efecto de los diferentes tratamientos (* $P < 0.05$).

Los datos indicados mediante el programa Cromagen permitieron realizar la comparación múltiple de Tukey-Kramer, mostrando diferencia significativa entre las longitudes (en μm) de las caudas del grupo tratado con PFOS (23 μM) contra el grupo control (Figura 21) ($P < 0.05$).

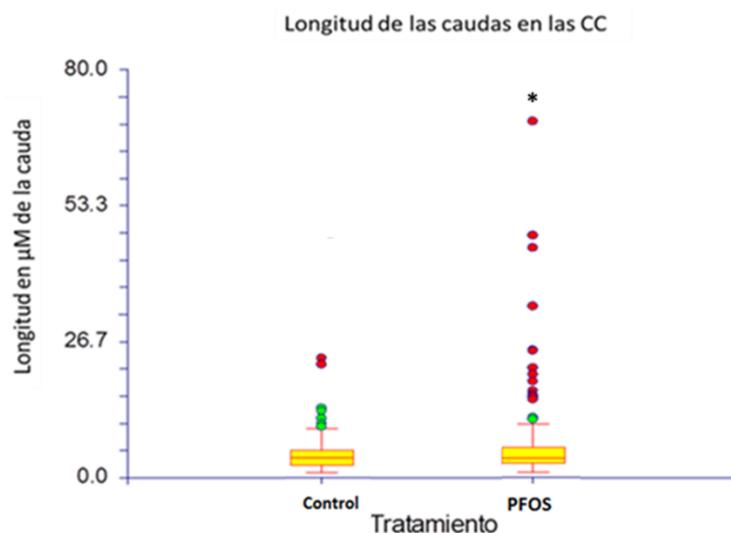


Figura 21. Longitud de las caudas en las CC expuestas a PFOS vs control. El grupo tratado con PFOS muestra caudas más grandes con respecto grupo control (* $P < 0.05$).

El porcentaje de ADN en las caudas definido como la cantidad de fragmentos de ADN desplazados mediante la electroforesis. no mostró diferencias significativas entre el grupo tratado con PFOS (23 μM) contra el grupo control al realizar la comparación múltiple de Tukey-Kramer, la comparación entre los tratamientos se muestra en la figura 22.

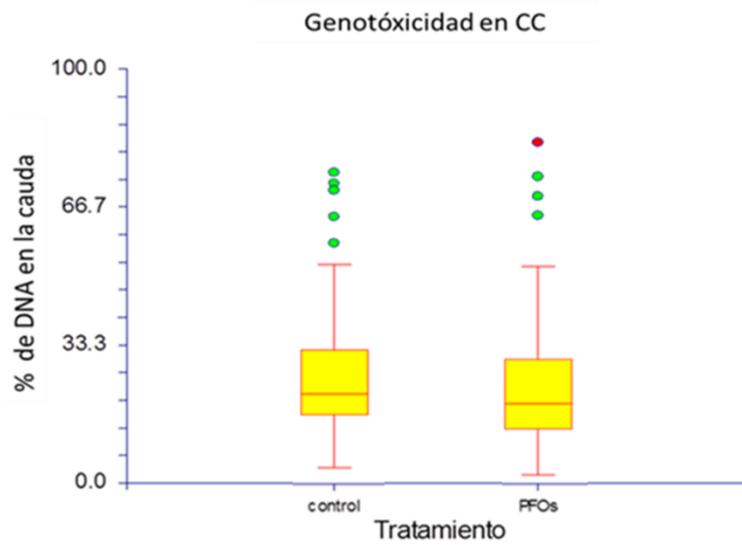


Figura 22. Porcentaje de ADN en las caudas de los cometas del grupo control contra PFOS (23 μ M). Los porcentajes de ADN en las caudas fueron iguales en el grupo tratado con PFOS y el grupo control.

9.7.2 Daño al ADN en los ovocitos.

Los ovocitos se procesaron utilizando la misma metodología que las CC. Se realizaron al menos 6 ensayos, utilizando las mismas concentraciones de PFOS, DMSO y H₂O₂ (Figura 23). En algunos ensayos se observaron algunos cometas en los distintos tratamientos, sin embargo los resultados no fueron reproducibles en cada experimento y el efecto genotóxico del PFOS no se pudo evaluar.

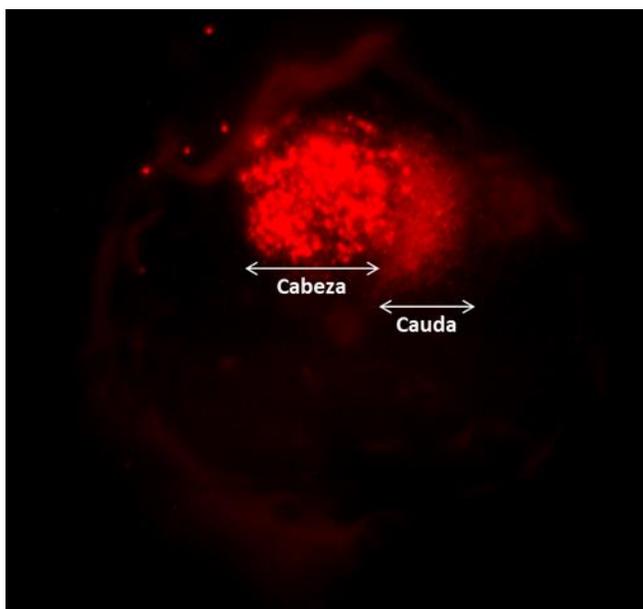


Figura 23. Cometa en un ovocito a 100 X. En la figura se observa claramente una cauda.

10. Discusión

Los PFCS son compuestos sintéticos, ubicuos y altamente persistentes en el medio ambiente. Entre estos se encuentra el PFOS el cual es utilizado en una amplia variedad de productos entre los que se encuentran espumas contra incendios, aerosoles, revestimientos para telas, alfombras, ropa y plaguicidas (Kissa, 2001; Prevedouros *et al.*, 2006). Además de los productos anteriores existen reportes sobre la presencia de PFOS en el aire, ya que este compuesto se adhiere a las partículas de polvo, que circula en el interior de las oficinas, vehículos y hogares (Fraser *et al.*, 2013). Las principales fuentes de exposición en la población en general aún no están completamente claras. Domingo (2011) y Falandysz *et al.*, 2006 concluyen que la principal fuente de exposición a los PFCS es la dieta; el consumo de carnes rojas, grasas animales, pescado, y botanas (ejemplo: palomitas de maíz, papas fritas, etc.) (Ericson *et al.*, 2008; Tittlemier *et al.*, 2007).

En un estudio en el que se determinó la presencia de sustancias perfluoroalquiladas en regiones tropicales y subtropicales de los Océanos Atlántico, Pacífico e Índico se reportó que el PFOS fue el compuesto más abundante, constituyendo el 33% del total de éstos (González- Gaya *et al.*, 2014). Los PFCS pueden ingresar al organismo por medio del consumo de productos del mar contaminados como pescado magro, hígado de pescado, mariscos, contribuyen con la mayor parte en la ingesta de los PFCS. Se considera que por esta vía ingresa el 81% del PFOS a los humanos (Haug *et al.*, 2010), a pesar de esto, aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual el PFOS pasa a través de las membranas celulares. Una vez dentro del organismo el perfluorado se transporta unido a la albumina, esta proteína básicamente se encuentra en todo el organismo y es considerada la proteína más abundante en el plasma sanguíneo, la unión PFOS-albumina, es mediante múltiples interacciones no covalentes como las hidrofóbicas, las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrogeno (Zhang *et al.*, 2009). En individuos no ocupacionalmente

expuestos se ha detectado el PFOS en diferentes órganos como hígado, riñón, tejido adiposo, cerebro, ganglios, hipófisis, tiroides, pulmón, páncreas, gónadas, tejido esquelético, sangre y fluido folicular (Governini *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2011). Debido a que el PFOS se ha relacionado con diversas alteraciones en la salud reproductiva tanto en animales como en el humano, en el presente estudio se evaluó el efecto del PFOS en la viabilidad, la maduración y el efecto genotóxico en ovocitos y células cúmulo después de la MIV.

Los resultados de la evaluación de los tratamientos controles con diferentes porcentajes del diluyente, no mostraron efectos adversos en ninguno de los parámetros evaluados, estos datos coinciden con los resultados de trabajos publicados sobre criopreservación de células madre e injertos osteocondrales, en los que se utilizaron diferentes concentraciones de DMSO (<2 hasta 10 %) (Thirumala *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2002). De esta manera se puede concluir que los resultados obtenidos en el presente estudio se debieron al efecto del PFOS y no del diluyente.

Actualmente no existen reportes sobre concentraciones letales y subletales del PFOS en la viabilidad de ovocitos y CC, por lo cual, se evaluaron distintas concentraciones de este compuesto. Las concentraciones evaluadas fueron 0, 12.5, 25, 50, 100, 150, 300, 500, 1000 μM , aquellas que mostraron efecto letal fueron 150 a 1000 μM , mientras que las concentraciones de 12.5 a 100 μM mostraron un efecto moderado, por lo que a partir de éstas se realizaron experimentos con el objetivo de encontrar la CL_{50} en los ovocitos y las CC que son similares a las de estudios realizados en una línea celular de fibroblastos COS-1 en los cuales se utilizaron concentraciones de 1 a 250 μM de PFOS para medir la proliferación de peroxisomas (Wolf *et al.*, 2008). Estudios *in vivo* realizados con ratas preñadas, se utilizaron concentraciones de 2.0 mg/Kg, los resultados mostraron severas histopatologías pulmonares en las crías recién nacidas, ya que las células presentaban lesiones por oxidación y muerte por apoptosis (Chen *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

La disminución en la viabilidad y la MIV observada en el presente trabajo, se encuentra en concentraciones de 11, 31 y 90 μM (CIM_{50} , CL_{50} en ovocitos y CL_{50} en CC, respectivamente). En los ovocitos las concentraciones de PFOS utilizadas para calcular la CL_{50} estuvieron dentro de un intervalo de 0 a 50 μM . La CL_{50} fue de 31 μM , esta concentración es una referencia muy importante, debido a que existen reportes de individuos laboralmente expuestos con una concentración de 26 μM de PFOS en plasma sanguíneo (Olsen *et al.*, 2003). Un estudio de fertilidad en mujeres sometidas a programas de FIV y transferencia embrionaria reportó una disminución en la tasa de fertilización hasta el 70%; esta disminución se relacionó con la presencia 13 ng/mL (0.026 μM) de PFCS en el fluido folicular (Governini *et al.*, 2011).

La inhibición de la maduración de los ovocitos observada en el presente trabajo podría deberse a la alteración de la funcionalidad de las CC, donde el PFOS podría alterar las funciones de transporte de iones, nutrientes y otros factores hacia el ovocito; las CC poseen receptores hormonales para LH y FSH, estas hormonas van a reactivar la maduración del ovocito, rompiendo la VG, hasta alcanzar la MII. Este proceso puede alterarse por la presencia de xenobióticos (Scaglia *et al.*, 2009). Algunos estudios consideran al PFOS como un disruptor endocrino (Caserta *et al.*, 2013), debido a esta característica el compuesto perfluorado podría competir por los receptores hormonales e inhibir la estimulación de la maduración de los gametos expuestos.

En relación con los gametos masculinos, en un estudio en el que se relacionó la presencia de PFCS y la función testicular se observó que la concentración espermática del eyaculado disminuyó de 15.5 a 6.2 millones cuando los hombres tenían concentraciones plasmáticas de 24.5 ng/mL (0.049 μM) (Joensen *et al.*, 2009), a pesar de ello no existen reportes de muerte en los gametos masculinos.

Estos antecedentes junto con otros datos (Campagna *et al.*, 2001; Casas *et al.*, 2010) y los resultados aquí presentados permiten suponer que los gametos femeninos son más susceptibles a los efectos adversos del PFOS en comparación con las células somáticas e inclusive los gametos masculinos.

En el caso de las CC la CL_{50} fue 90 μM . Las CC por su posición son las primeras en estar en contacto con el compuesto perfluorado. Las CC presentan características particulares, su función es proveer de nutrientes, iones, además de poseer receptores hormonales, entre otros aspectos que son necesarios para la maduración del ovocito. Estudios *in vitro* demuestran que las CC además tienen efectos benéficos en los cocultivos, ya que ayudan a eliminar sustancias nocivas, en particular metales pesados, amonio y formación de radicales libres, por lo tanto también participan en la desintoxicación de los medios de cultivo (Cihangir *et al.*, 2010). Otros estudios *in vitro* indican que las CC tiene un papel importante en la estimulación de la síntesis de glutatión (GSH) en los ovocitos, lo cual ayuda a contrarrestar los efectos de los radicales libres (Tatemoto *et al.*, 2000).

Se eligió evaluar el daño sobre el ADN del PFOS exponiendo los COCs a una concentración de 23 μM durante 44 h de MIV, esta concentración correspondió a $\frac{1}{4}$ de la CL_{50} de las CC y a la de inhibición del 100% de la maduración de los ovocitos (22 μM). Dicha concentración permitió evaluar el efecto en el ADN provocado por la exposición al perfluorado y no a la muerte celular, ya que con esta concentración el porcentaje de viabilidad fue del 90 y 60 % en las CC y los ovocitos respectivamente.

En las CC con la concentración de 23 μM ($\frac{1}{4} CL_{50}$) no se detectó diferencia en el contenido de ADN en las caudas. Sin embargo se observó un efecto genotóxico al tomarse en cuenta la longitud de las caudas indicando que el PFOS produce fragmentos ADN significativamente más pequeños en el grupo tratado que los producidos en el grupo control. Estos datos difieren de lo observado en otras células

somáticas, ya que en un trabajo realizado en células de hepatoma humano cultivadas en presencia de PFOS con concentraciones de 5 a 300 μM , (Florentin *et al.*, 2011) y en la línea celular hepática HepG2 con 0.4 a 2000 μM (Eriksen *et al.*, 2010), no se detectó efecto genotóxico.

Un estudio realizado por Governini *et al.*, 2011, reportó la presencia de PFCS en fluido folicular a una concentración de aproximadamente 13 ng/ml (0.026 μM), a pesar de ser concentraciones muy bajas la presencia de estos compuestos debe tomarse en cuenta, ya que se ha indicado que estos compuestos son capaces de unirse al ADN, esta unión se lleva a cabo por interacción de la parte hidrofóbica del PFOS (cadena carbonada) con las bases adenina y guanina en una de las cadenas y en la complementaria se unen a las bases pirimídicas, timina y citosina. Cuando algunos xenobióticos interactúan con el ADN, los enlaces no covalentes de la molécula pueden romperse y originar un cambio conformacional e incluso conducir a la pérdida de la función (Zhang *et al.*, 2009).

Los mecanismos de acción del PFOS en gametos no están descritos; existen reportes sobre el uso de biomarcadores ambientales que pueden ayudar a comprender los mecanismos de acción de los PFCS. Un estudio realizado en lombrices de tierra expuestas a un suelo contaminado con PFOS indicó que este compuesto fue capaz retrasar su crecimiento e inducir estrés oxidante (EO) mediante la inhibición de la actividad de las enzimas antioxidantes como son la superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y glutatión peroxidasa, los efectos del estrés oxidante, detectado por producción de malondialdehído, el cual produjo daño en las membranas celulares y genotoxicidad (Xu *et al.*, 2013). Por otra parte, estudios con modelos murinos reportaron efectos similares, donde el PFOS fue causante de neurotoxicidad provocada por especies reactivas de oxígeno (EROS), la muerte de las células neuronales se debió a un incremento de EROS cuando se expusieron a una concentración de 30 μM de dicho perfluorado.

Las EROS causan la fragmentación del ADN y provocan un incremento de la actividad de la caspasa 3, dando origen a la muerte neuronal por apoptosis mediante la vía de señalización de la proteína cinasa C (PKC) (Lee *et al.*, 2012; Reistad *et al.*, 2013). En la línea de células cancerosas de pulmón humano A549 expuestas a PFOS indujo la muerte celular manera dependiente de la concentración. La apoptosis fue caracterizada por el incremento de la sub-G1, la activación de la caspasa 3 y 9 y la expresión de mRNA de Bax/Bcl-2; además, se detectó una disminución en los niveles basales de GSH, un aumento del malondialdehído y de la actividad de la enzimática de la superóxido dismutasa. Estos parámetros indican una producción EROS que dañan las membranas biológicas provocando la muerte celular por apoptosis (Mao *et al.*, 2012).

Los estudios de los mecanismos de acción del PFOS en células somáticas se ha enfocado a describir la muerte celular por apoptosis Wang *et al.*, (2013) describieron este mecanismo utilizando células híbridas de humano-hámster y se concluyó que la muerte celular y la generación de EO estaba mediado por una vía dependiente de la mitocondria.

La muerte de las CC y del ovocito por exposición a PFOS no está completamente descrita, en gametos no se conoce el mecanismo de acción del perfluorado, es claro que los gametos son tipos celulares muy susceptibles a cualquier xenobiotico, por lo tanto, en el presente trabajo, las concentraciones que se requirieron para alterar su viabilidad y maduración fueron concentraciones relativamente bajas (CL₅₀ 31 µM y CIM₅₀ 11 µM respectivamente) en comparación con las células somáticas (CC CL₅₀ 90 µM).

El efecto genotóxico del PFOS en las CC se evaluó mediante la cuantificación de número de células con daño en el ADN, el análisis del porcentaje de ADN y longitud de las caudas de los cometas. Con respecto al parámetro de porcentaje de ADN en

las caudas, no se observó diferencia entre el grupo incubado con el compuesto perfluorado durante la MIV y el control. Sin embargo los resultados sugieren efecto genotóxico, ya que los parámetros de porcentaje de células con daño al ADN y la longitud de las caudas de los cometas fueron mayores en el grupo tratado con PFOS en comparación con el control. Éste es un indicador de aumento de la fragmentación del ADN, por lo tanto una mayor migración de los fragmentos. En el caso de los ovocitos expuestos al perfluorado no se pudo evaluar el efecto genotóxico, trabajos previos con este tipo celular, sugieren la eliminación de la zona pelúcida con proteasa al 0.1% (w:v) ya que dicha estructura no se rompe con la solución de lisis, además también se sugiere el uso de acetona para la eliminación de los lípidos (Tatemoto et al. 2000; Yuan *et al.*, 2008).

La fragmentación del ADN puede indicar la presencia de EROS y podría ser uno de los mecanismos de muerte celular en los ovocitos y CC. Esto ya fue demostrado en trabajos con células somáticas en donde se presentó un efecto genotóxico y la generación de EO (Mao *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Sin embargo, se requieren evaluar algunos parámetros de EO para corroborar si es este el mecanismo de acción en los gametos femeninos; algunos de los parámetros que se podría evaluar serían la generación y fuente de EROS, lipoperoxidación, expresión de enzimas antioxidantes y otro parámetro de genotoxicidad como la cuantificación de la 8-hidroxi guanina.

Para que se lleve a cabo la reproducción es necesario que procesos como la maduración de los gametos, la fertilización, el desarrollo embrionario temprano, gestación y finalmente el nacimiento, se efectúen sin contratiempos, retrasos o alteraciones. Cualquier cambio en alguno de estos procesos puede alterar la fertilidad de los individuos o causar efectos dañinos en la descendencia. El efecto de diversos xenobióticos ambientales sobre la MIV de los ovocitos porcinos ha sido reportado en diferentes estudios (Campagna *et al.*, 2001; Casas *et al.*, 2010) Insecticidas como

diazinón y malatión, y herbicidas como atrazina y fenoxaprop-etil mostraron que su presencia durante la MIV fue capaz de afectar la maduración induciendo un bloqueo del paso de los ovocitos de la VG a la MI (Casas *et al.*, 2010). El empleo de compuestos organoclorados produjo una maduración incompleta y la disminución en la producción de blastocistos. (Campagna *et al.*, 2001).

El efecto del PFOS en los COCs puede alterar la maduración y la viabilidad del ovocito ya sea actuando directamente sobre el gameto o a través de las CC que rodean al ovocito.

11. Conclusiones.

- Los resultados de este trabajo muestran que el PFOS puede afectar reproducción ya que mostró un efecto negativo en los parámetros de viabilidad y maduración de los ovocitos porcinos así como en la viabilidad de las CC.
- El PFOS en el medio de MIV disminuyó la viabilidad y la maduración de los ovocitos a medida que aumentó la concentración. La CL_{50} determinada fue de 31 μM y la CIM_{50} de 11 μM .
- La maduración de los ovocitos mostró una gran sensibilidad al PFOS ya que comparando la CL_{50} con la CIM_{50} se requirió una concentración tres veces menor para inhibir la maduración que la requerida para inducir la muerte.
- En las CC, el PFOS disminuyó la viabilidad de manera dependiente de la concentración, donde se requirió 90 μM para disminuir al 50% la viabilidad de las células.
- Los ovocitos fueron más susceptibles que las CC al efecto adverso del PFOS, ya que la concentración requerida para inhibir el 50 % de la viabilidad fue tres veces menor que en el caso de las CC (33 μM contra 90 μM respectivamente).
- En las CC la concentración subletal 23 μM de PFOS incrementó el porcentaje de células con daño al ADN; el aumento en la longitud de las caudas en el ensayo cometa sugiere mayor fragmentación del ADN, lo anterior permite considerar a este compuesto perfluorado como un agente genotóxico.

12. Perspectivas.

- Continuar con la evaluación del efecto genotóxico en ovocitos mediante el ensayo cometa incluyendo algunas modificaciones, como la eliminación de la ZP y/o eliminación del contenido lipídico por tratamiento con acetona o centrifugación, empleando concentraciones subletales.

- Determinar si la muerte celular observada en el presente trabajo es debida a un proceso apoptótico.

- Evaluar otros mecanismos de daño del PFOS durante la MIV en ovocitos y CC como la generación de EO.

- Estudiar si el efecto producido por el PFOS durante la MIV puede tener implicaciones en la fertilización y/o el desarrollo embrionario temprano.

13. Bibliografía.

- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. (1998). Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biology of Reproduction*. 58: 1316-1320.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Resumen de salud pública perfluoroalquilos. 2009. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html> (Consultada en febrero de 2014).
- Álvarez E, Ripalda P, Forriol F. (2002). Injertos osteocondrales a presión conservados a -80 °C. Efecto de la criopreservación con dimetil silfóxido (DMSO). Estudio experimental en corderos. *Mapfre Medicina*. Vol. 13, No. 2: 16-24.
- Bachtrög D, Mank J, Peichel C, Kirkpatrick M, Otto S, Ashman T, Hahn M, Kitano J, Mayrose I, Ming R, Perrin N, Ross L, Valenzuela N, Vamosi J. (2014). The tree sex consortium. Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It?. *PLOS Biology*. 12: 7. 1-13.
- Bello J, López de Cerain A. (2001). Fundamentos de ciencia Toxicológica. Editorial Día de Santos. España pp. 315-325.
- Betancourt M, Casas E, Bonilla E, Ducolomb R. (2003). Maduración de gametos y fertilización en mamíferos. Cap. 22. En: *Biología celular y molecular*. Ed. Prentice Hall. México. Pp. 679-710. UAM-PUIS. pp. 55-73.

- Bonilla E, Altamirano M, Casas E, Fierro R, Ducolomb Y, Betancourt M. (2001) Identificación de reprotóxicos en el laboratorio. *Biología de la Reproducción II UAM-PUIS*. pp. 55-73.
- Caméan A, Repetto M. (2006). *Toxicología alimentaria*. Editorial Diaz de Santos, España. pp. 111.
- Campagna C, Sirard MA, Ayotte P, Bailey JL. (2001). Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. *Biology of Reproduction*. 65: 554-560.
- Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in vitro*. 24:224-230.
- Cassone C, Vongphachan V, Chiu S, Williams K, Letcher R, Pelletier E, Crump D, Kennedy S. (2012). In Ovo Effects of Perfluorohexane Sulfonate and Perfluorohexanoate on Pipping Success, Development, mRNA Expression, and Thyroid Hormone Levels in Chicken Embryos. *Toxicological Sciences*. 127: 216–224.
- Caserta D, Ciardo F, Bordi G, Guerranti C, Fanello E, Perra G, Borghini F, La Rocca C, Tait S, Bergamaso B, Stecca L, Marci R, Lo Monte G, Soave I, Focardi S, Montovani A, Moscarini M. (2013). Correlation of Endocrine Disrupting Chemicals Serum Levels and White Blood Cells Gene Expression of Nuclear Receptors in a Population of Infertile Women. *International Journal of Endocrinology*. ID 510703. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/510703>

- Cossio M, González H, Garcia C, Prieto E. (2004). Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 23: 277-84.
- Connon R, Geist J, Werner I. (2012). Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors*. 12, 12741-12771; doi:10.3390/s120912741
- Chen T, Zhang L, Yue J-q, Lv Z-q, Xia W, Wan Y-Y, Li Y-y, Xu S-q. (2012). Prenatal PFOS exposure induces oxidative stress and apoptosis in the lung of rat off-spring. *Reproductive Toxicology*. 33: 538–545.
- Cihangir N, Görkemli H, Özdemir S, Aktan M, Duman S. (2010). Influence of cumulus cell coculture and cumulusaided embryo transfer on embryonic development and pregnancy rates. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*. 11: 121-6.
- De los Reyes M. (2011). Maduración nuclear y citoplasmática in vitro en ovocitos de perra. *Spermova*. 1: 53-57.
- Devjak R, Fon Tacer K, Juvan P, Virant Klun I, Rozman D, Vrtac̃nik B. (2012). Cumulus Cells Gene Expression Profiling in Terms of Oocyte Maturity in Controlled Ovarian Hyperstimulation Using GnRH Agonist or GnRH Antagonist. *Plos One*. 7.
- Domingo (2012). Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. *Environment International*. 40: 187–195.

- DRAFT Indicator for Third Edition of America's Children and the Environment, February 2011. Disponible en: www.epa.gov/ace/ace3drafts/ (Consultada en mayo de 2014).
- Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M., Betancourt, M. (2009). In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biology and Toxicology* 25:623–633.
- Eriksen K, Raaschou-Nielsen O, Rousgaard M, Loft S, Moller P. (2010). Genotoxic potential of the perfluorinated chemicals PFOA, PFOS, PFBS, PFNA and PFHxA in human HepG2 cells. *Mutation Research*. 700: 39–43.
- Ericson I, Martí-Cid R, Nadal M, Van Bavel B, Lindström G, Domingo JL. (2008). Human exposure to perfluorinated chemicals through the diet: intake of perfluorinated compounds in foods from the Catalan (Spain) market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:1787–1794.
- Falandysz J, Taniyasu S, Gulkowska A, Yamashita N, Schulte-Oehlmann U. (2006). Is fish a major source of fluorinated surfactants and repellents in humans living on the Baltic Coast? *Environmental Science & Technology* 40:748–51.
- Fei C, McLaughlin J, Tarone R, Olsen J. (2008). Fetal Growth Indicators and Perfluorinated Chemicals: A Study in the Danish National Birth Cohort. *American Journal of Epidemiology*. 168: 66-72.

- Fei C, McLaughlin J, Lipworth L, Olsen J. (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Human Reproduction*. 24; 5: 1200–1205.
- Florentin A, Deblonde T, Diguio N, Hautemaniere A, Hartemann. (2011). Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: Cytotoxicity but no genotoxicity?. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 214: 493– 499.
- Fraser A, Webster T, Watkins D, Strynar M, Kato K, Calafat A, Vieira V, McClean M. (2013). Polyfluorinated compounds in dust from homes, offices, and vehicles as predictors of concentrations in office workers' serum. *Environment International*. 60: 128–136.
- Goosey E, Harrad S. (2012). Perfluoroalkyl substances in UK indoor and outdoor air: Spatial and seasonal variation. *Environment International*. 45: 86–90.
- Governini L, Orvieto R, Guerranti C, Gambera L, De Leo V, Piomboni P. (2011). The impact of environmental exposure to perfluorinated compounds on oocyte fertilization capacity. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 28:415–418.
- Gilbert S. (2005). Desarrollo embrionario. 7a Edición, Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires., p. 902.

- Hafez E. Hafez B. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Ed. McGraw-Hill interamericana. México. pp. 70-82.
- Haug L, Thomsen C, Brantsætera A, Kvalem A, Haugen M, Becher G, Alexander J, Meltzer H, Knutsen H,(2010). Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans. *Environment International*. Volume 36, Issue 7, Pages 772–778.
- Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers H, Rodgers R. (2014). Transcriptome Profiling of the Theca Interna in Transition from Small to Large Antral Ovarian *Follicles*. Vol. 9: 5.
- Homepage of the Chemical Abstracts Service (CAS). (13 de agosto de 2014). Disponible en: <http://www.cas.org/content/chemical-substances>.
- Hölzer J, Midasch O, Rauchfuss K, Kraft M, Reupert R, Angerer J, Kleeschulte P, Marschall N, Wihelm M. (2008). Biomonitoring of Perfluorinated Compounds in Children and Adults Exposed to Perfluorooctanoate-Contaminated Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*. 116; 5.
- Jacquet N, Maire M, Landkocz Y,Vasseur P. (2012). Carcinogenic potency of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Arch Toxicol* 86:305–314.
- Joensen N, Bossi R, Leffers H, Jensen A, Skakkebak N, and Jørgensen N. (2009). Do Perfluoroalkyl Compounds Impair Human Semen Quality? *Environmental Health Perspectives*. 117:923-927.

- Kato K, Wong L-Y, Jia LT, Kuklennyik Z, Calafat AM. (2011). Trends in exposure to polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: 1999–2008. *Environmental Science and Technology*. 45 (19):8037–8045.
- Kissa E. (2001). Fluorinated Surfactants and Repellents. 2. Marcel Dekker; New York.
- Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. 2007. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences* 99:366–394.
- Lee H-G, Lee Y, Yang J-H. (2012). Perfluorooctane sulfonate induces apoptosis of cerebellar granule cells via a ROS-dependent protein kinase C signaling pathway. *Neurotoxicology*. 33: 314–320.
- Nelson J, Hatch E, Webster T. (2010). Department of Environmental Health, and Department of Epidemiology, Boston University School of Public Health, USA. 118:197-202.
- Martínez B. (2002). Estudio de la fecundación “*in vitro*” en porcino: reducción de la polispermia y optimización de la producción “*in vitro*” de embriones. Tesis de doctorado. Madrid. Universidad complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Departamento de patología animal II. [En línea], 01-07-2013. Disponible en internet: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/vet/ucm-t26293.pdf>
- Mao Z, Xia W, Wang J, Chen T, Zeng Q, Xu B, Li W, Chen X, Xu S. (2012). Perfluorooctane sulfonate induces apoptosis in lung cancer A549 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondriondependent pathway. *Journal of Applied Toxicology*. 33: 1268–1276.

- Novotná B, Petr J, Sedmiková M, Kratochvilová J, Jílek F. (2009). Effect of different activation modes on DNA integrity of porcine MII oocytes in vitro. *Zygote*. 18: pp. 81–87.
- Olsen GW, Burris JM, Burlew MM, Mandel JH. (2003). Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 45:260–270.
- Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH. (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental Science & Technology*. 40:32–44.
- Repetto M. (1997). Toxicología fundamental, 3.a edición, ed. Diaz de Santos, españa. pp. 17-40.
- Reistad T, Fonnum F, Mariussen E. (2013). Perfluoroalkylated compounds induce cell death and formation of reactive oxygen species in cultured cerebellar granule cells. *Toxicology Letters*. 218: 56–60.
- Sáenz J, Asuero MS, Correa C, Cuevas B, Gómez V, Linares Q, Páez B, Castellón R, Pascual J, Burgos FJ. (2008). Modelos experimentales para la investigación y el entrenamiento en trasplante renal. *Actas Urológicas Españolas*. 32(1):83-90.
- Shankar A, Xiao J, Ducatman A. (2011). Perfluoroalkyl chemicals and elevated serum uric acid in US adults. *Clinical Epidemiology* 3: 251–258.

- Scaglia H, Chichizola C, Franconi M, Ludueña B, Mastandrea C, Scaglia J. (2009). Disruptores endocrinos. Composición química, mecanismo de acción y efecto sobre el eje reproductivo. *Reproducción*. 24:74-86.
- SEMARNAT. (2012). Género, ambiente y contaminación por sustancias químicas. México. pp. 95-111.
- Su Y-Q, Sugiura K, Eppig J. (2009). Mouse Oocyte Control of Granulosa Cell Development and Function: Paracrine Regulation of Cumulus Cell Metabolism. *Journal Seminars in Reproductive Medicine*. 27: 32–42.
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. (2000). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death cause by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*. 63: 805-810.
- Thirumala S, Gimble J, Devireddy R. (2010). Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells and Development*. 19; 4: 513-522.
- Tittlemier SA, Pepper K, Seymour C, Moisey J, Bronson R, Cao X-L, Dabeka RW. (2007). Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:3203–3210.
- Toft G, Jonsson B, Lindh C, Giwercman A, Spano M, Heederik D, Lenters V, Vermeulen R, Rylander L, Pedersen H, Ludwicki J, Zvezdai V, Bonde J.

(2012). Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in arctic and European populations. *Human Reproduction*. 27; 8: 2532–2540.

- Urrego R, Pareja A, Vásquez N, Márquez M. (2005). El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. 18:3.
- U.S. Public health statement (STSDR). PERFLUOROALKYLS. 2009. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp200-c1.pdf> (consultada en marzo de 2014).
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). (2012). Emerging Contaminants Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA). (Consultada en abril 2014). Disponible en: http://www.epa.gov/fedfac/pdf/emerging_contaminants_pfos_pfoa.pdf
- Verlhac M-H, Villeneuve A. (2010). Oogenesis: the universal process. Edit. John Wiley & Sons (WILEY-BLACKWELL). Pp.181-193.
- Vinardell M. (2007). Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. *Acta Bioethica*. 13;1.
- Villanueva C, Kogevinas M, Cordier S, Templeton M, Vermeulen R, Nuckols J, Nieuwenhuijsen M, Levallois P. (2014). Assessing Exposure and Health Consequences of Chemicals in Drinking Water: Current State of Knowledge and Research Needs. *Environmental Health Perspectives*. 122(3): 213–221.
- Vongphachan V, Cassone C, Wu D, Chiu S, Crump D, Kennedy S. (2011). Effects of Perfluoroalkyl Compounds on mRNA Expression Levels of Thyroid

Hormone-Responsive Genes in Primary Cultures of Avian Neuronal Cells. *Toxicological Sciences* 120; 2: 392–402.

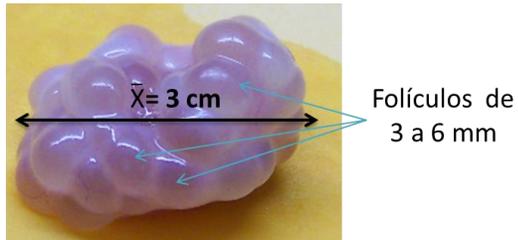
- Wang W, Niwa K, (1995). Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocyte in a serum free medium. *Zigote*. 3:345-350.
- Wang X, Zhao G, Liang J, Jiang J, Chen N, Yu J, Wang Q, Xu A, Chen S, Wu L. (2013). PFOS-induced apoptosis through mitochondrion-dependent pathway in human–hamster hybrid cells. *Mutation Research*. 754: 51– 57.
- Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick. (2008). *Biología Molecular del Gen*. Editorial Médica Panamericana. 5 ta ed. España. Pp: 253-274.
- Werven F, and Amon A. (2011). Regulation of entry into gametogenesis. *Philosophical Transactions.of the Royal. Society. B*. 366, 3521–353
- Williams S., Fernandez V., De la Sota R. (2010). Dinamica Folicular y momento de la ovulación en cerdas púberes y pluríparas posdestete. *Investigación Veterinaria*. (B. Aires). 33-42.
- Wolf C, Takacs M, Schmid J, Lau C, Abbott B. (2008). Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha by Perfluoroalkyl Acids of Different Functional Groups and Chain Lengths. *Toxicological Sciences*. 106; 1: 162–171.

- Xu D, Li C, Wen Y, Liu W. (2013). Antioxidant defense system responses and DNA damage of earthworms exposed to Perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Environmental Pollution*. 174: 121-127.
- Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*, Segunda ed. New York: Raven Press, Ltd., 189-316.
- Yang B, Zou W, Hu Z, Liu F, Zhou L, Yang S, Kuang H, Wu L, Wei J, Wan J, Zou T, Zhang D. (2014). Involvement of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Injury Caused by Perfluorooctanoic Acid Exposure in Mice. *BioMed Research International*. Article ID 409837.
- Yuan Y, Hao Z.D., Liu J, Wu Y, Yang L, Liu G.S., Tian J.H., Zhu S.E., Zeng S.M. (2008). Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology* 70: 168–178.
- Zhang X, Chen L, Fei X-C, Ma Y-S, Gao H-W. (2009). Binding of PFOS to serum albumin and DNA: insight into the molecular toxicity of perfluorochemicals. *BMC Molecular Biology*. 10:16.
- Zhao Z, Xie Z, Möller A, Sturm R, Tang J, Zhang G, Ebinghaus R. (2012). Distribution and long-range transport of polyfluoroalkyl substances in the Arctic, Atlantic Ocean and Antarctic coast. *Environmental Pollution*. 170: 71-77

14. Anexo.

14.1 Metodología.

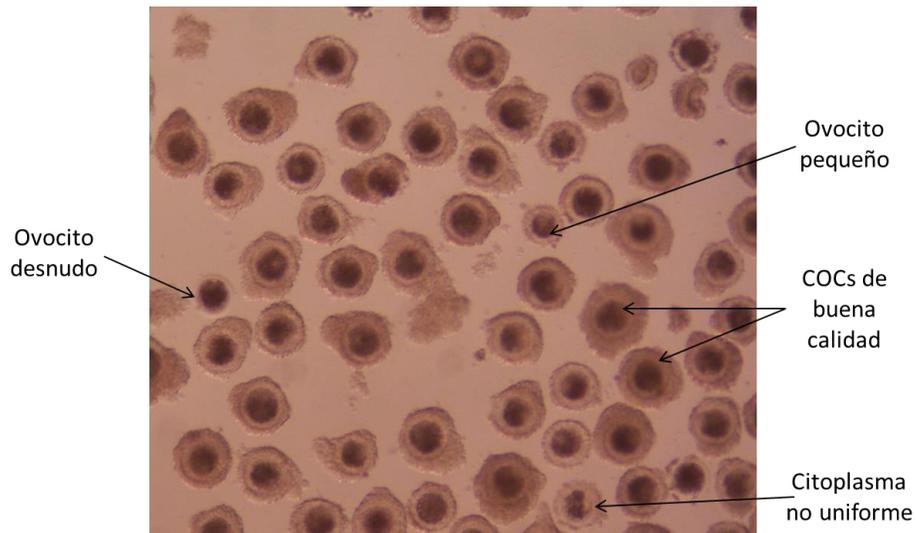
a) Criterios de selección de los folículos ováricos para la punción.



Ovario de cerda prepúber
(6 meses de edad)

b) Criterios de selección de los COCs para la MIV.

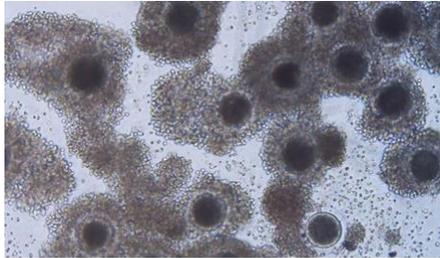
1. El ovocito debe tener mínimo 2 o 3 capas de CC.
2. El citoplasma de ovocito debe ser uniforme.
3. Los ovocitos seleccionados deben tener un tamaño uniforme.



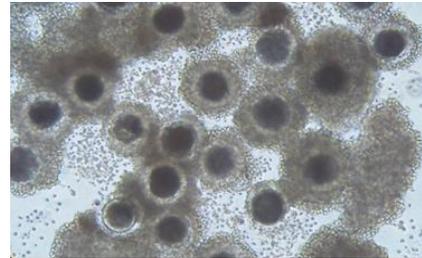
Selección de COCs antes de la MIV

14.2 Resultados.

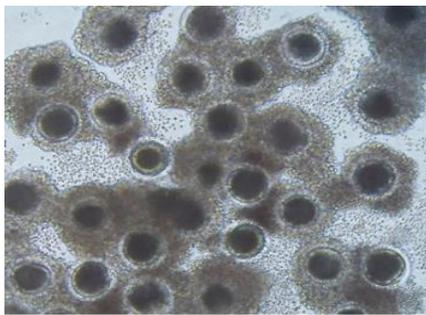
a) Expansión de las CC expuestas a diferentes concentraciones de PFOs después de 44 h de MIV.



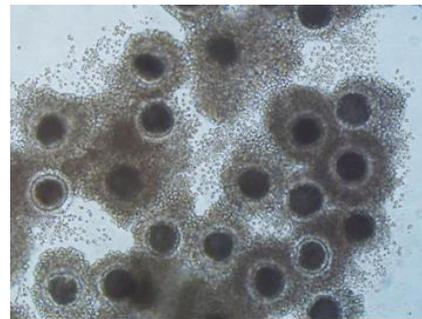
Control



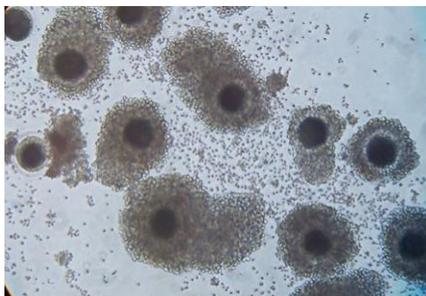
12.5 μM



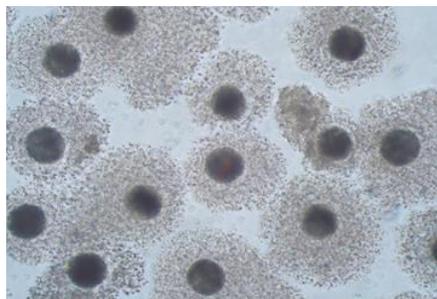
50 μM



25 μM

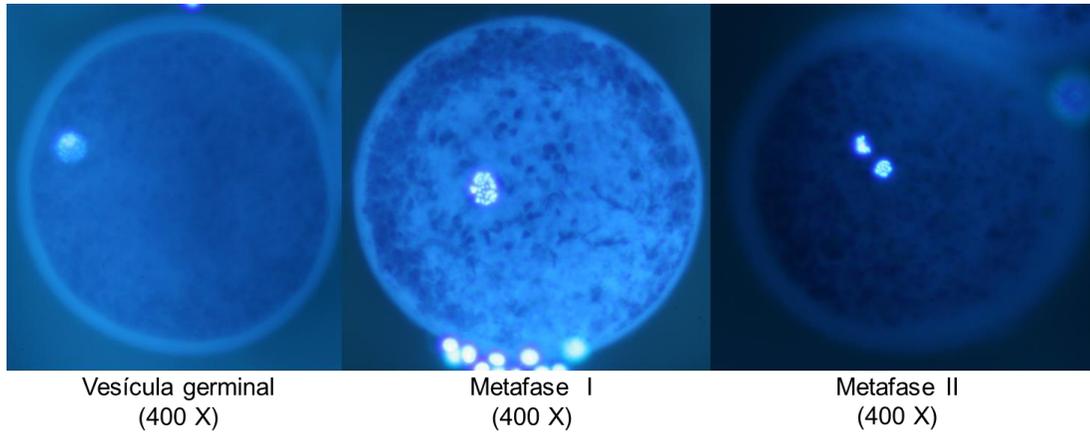


100 μM

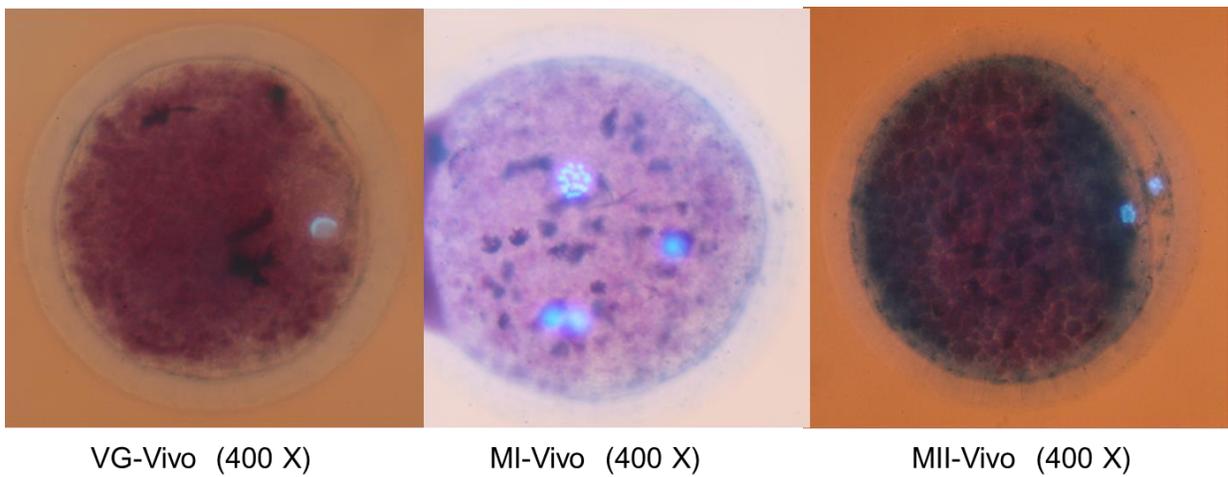


150 μM

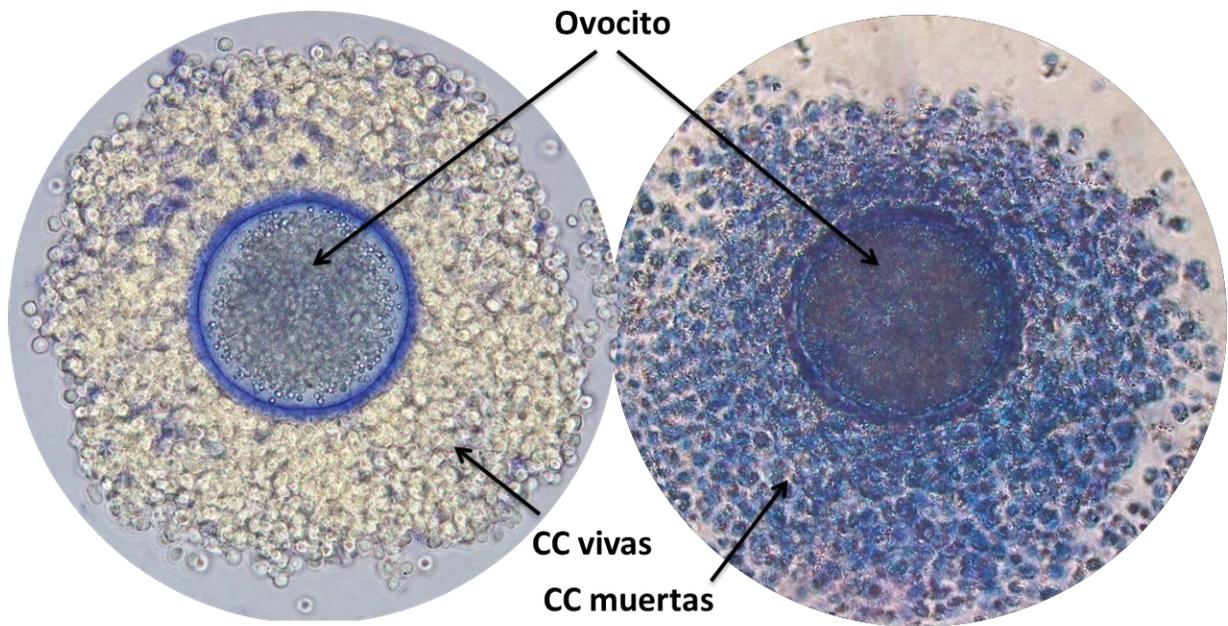
b) Criterios de evaluación de la maduración de los ovocitos después de 44 h de MIV utilizando la tinción de Hoechst 33258



c) Criterios de evaluación de la viabilidad de los ovocitos después de 44 h de MIV utilizando una doble tinción con MTT (viabilidad) y Hoechst 33258 (etapa de maduración).



d) Criterios de evaluación de la viabilidad de las CC teñidas con azul tripano al 0.5%. Las CC incoloras se consideraron vivas y las teñidas como muertas.



14.3 Medios de cultivo.

Medio TL-HEPES-PVA

componente	PM	mM	g/1000 mL	g/500 mL	g/250 mL
Na Cl	58.45	114.00	6.6633	3.3316	1.6658
KCl	74.55	3.20	0.2386	0.1193	0.0596
NaH ₂ PO ₄	120.00	0.34	0.0408	0.0204	0.0102
Lactato de Na*	112.10	10.00	1.4 ml	0.7	0.35
MgCl ₂ . 6H ₂ O	203.30	0.50	0.1017	0.0508	0.0254
HEPES	238.30	10.0	2.3830	1.1915	0.5957
Piruvato de Na	110.00	0.20	0.0220	0.011	0.0055
Sorbitol	182.20	12.00	2.1860	1.093	0.5465
NaHCO ₃	84.00	2.00	0.1680	0.084	0.042
Gentamicina	575.67		0.0250	0.0125	0.0062
Penicilina G	372.5		0.0650	0.0325	0.0162
PVA			0.1000	0.05	0.025
CaCl ₂ . 2H ₂ O**	147.00	2.00	0.2940	0.147	0.0735

*Solución al 60% (v/v)

**Agregar al final

Ajustar pH a 7.3 - 7.4 con "Na OH" o "HCl" 1N

Medio para maduración (TCM-199 in vitro, México) libre de proteínas para ovocitos porcinos.

TCM-199 suplementado con:

PVA	0.1%	10 g/L
D-Glucosa	3.05 mM	0.5496 g/L
Piruvato de sodio	0.91 mM	0.1 g/L
Penicilina	75 µg/mL	
Estreptomina	50 µg/mL	

Medio TCM-199 se suplementa con:

EGF	10 ng/mL
Cisteína	0.57 mM
LH	0.5 µg/mL
FSH	0.5 µg/mL

Nota: todos los medios anteriormente descritos se esterilizan mediante filtración, las membranas recomendadas para este procedimiento son de un diámetro de 0.22 µm y el almacenaje recomendado es por 3 semanas a una temperatura de 4° C.

14.3.1 Preparación de las hormonas

LH (SIGMA L 5269) 50 µg/mL. 100X

FSH (SIGMA F-2293) 50 µg/mL. 100X

- a) Pesar 0.005g de la hormona liofilizada y disolver en 10 mL de medio TCM-199, de esta manera tendremos una solución hormonal de 10X.
- b) De la solución anterior tomar 1 mL y diluir en 9 mL de medio TCM-199, finalmente tendremos una solución hormonal de 1X.
- c) De la solución anterior realizar alícuotas de 100 µL.
- d) Guardar alícuotas a -70° C.

14.3.2 Preparación del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

EGF (SIGMA E 4127) vial con 0.1 mg.

- a) Realizar una dilución en TCM-199 suplementado con BSA al 0.1 % para obtener una concentración de 100 µg/mL.
- b) De la solución anterior tomar 10 µL y diluirla en 990 µL de TCM-199 para tener una concentración de 1 µg/mL en un volumen final de 1000 µL.
- c) De la solución anterior hacer alícuotas de 200 µL
- d) Guardar alícuotas a -70 °C.

14.4 soluciones de la electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa).

Solución de lisis (1 litro).

Na OH		8 grs.
EDTA	100 mM	37.2 grs.
TRIS	10 mM	1.2 grs.
Na Cl	2.5 M	146.1 grs.

Notas:

- a) Na OH. Agregar 5 grs. Al inicio de la solución y 3 grs. Al final para ayudar a que se disuelvan los reactivos restantes.
- b) Ajustar la solución a pH: 10
- c) Aforar y guardar a 4 °C.
- d) Importante: antes de utilizar la solución suplementar con 1 % de tritón X-100 y 10 % de DMSO.

Buffer de neutralización (1 litro)

Tris (0.4 M) (48.5 grs./1 L)

Nota: ajustar pH con H Cl concentrado (>10 M), aforar a 1 litro, utilizar campana de extracción en el momento de trabajar con H Cl.

Buffer de electroforesis (300 mM Na OH/ 1mM EDTA)

Soluciones.

A) Na OH (10 N) (200 grs/ 500 mL H₂O destilada)

Nota: usar baño frío, agregar aproximadamente 10 grs al vaso hasta que se disuelva totalmente y repetir el procedimiento anterior hasta disolver los 200 grs durante la preparación de la solución se recomienda tapar con papel aluminio (papel aluminio con perforaciones) el recipiente.

B) EDTA (200 mM) (14.89grs/200 mL dH₂O, pH: 10)

Nota: se recomienda utilizar agua destilada (dH₂O), ajustar pH: 10 y aforar a 200 mL.

Agarosas.

A) Agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) 0.5%
250 mg.....50 mL de PBS (estéril)

B) Agarosa de punto de fusión normal (NMA) 1 %
500 mg.....50 mL de PBS (estéril)

Nota: calentar en el horno de microondas hasta que la solución tome una apariencia transparente.

Portaobjetos

Los portaobjetos esmerilados se limpian con etanol al 70 %. Los portaobjetos no esmerilados se dejan 3 días en una solución de: 50/50 (V/V) de etanol/metanol, se limpian con gasas estériles y se dejan secar a temperatura ambiente.

Nota: utilizar guantes libre de talco.