



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

**“Efecto del Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS) en la maduración
in vitro de ovocitos porcinos y su repercusión en la fertilización y el
desarrollo embrionario”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

P R E S E N T A

Lic. Biol Exp. Araceli Salomón García

Laboratorio de Biología Celular S-252 UAMI

Director

Dr. Eduardo Casas Hernández

Asesor

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Dra. Edith Arenas Ríos

México, D.F. 9 Diciembre del 2015

Miembros del Comité de Tutores

Director

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Biología Celular S-252

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

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: dino@xanum.uam.mx

Asesores

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Biología Celular S-252

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

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: duci@xanum.uam.mx

Edith Arenas Ríos

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida S-232

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: editharenas2000@yahoo.com.mx

Miembros del Jurado de Examen

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Biología Celular S-252

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

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: duco@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

Edith Arenas Ríos

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida S-232

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: editharenas2000@yahoo.com.mx

Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos

Laboratorio de Expresión Génica S-248

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: zayil.salazar@xanum.uam.mx

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Celular S-252 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT. Proyecto CB:2012-01-180043 y beca otorgada por CONACYT a Araceli Salomón García (CVU:570417)

“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”

Al rastro “Los Arcos” Edo. de México por la donación de los ovarios.

Gracias al comité tutorial por el apoyo brindado para la culminación de este proyecto.

Al Dr. Eduardo Casas, gracias por hacerme participe de su grupo de investigación, por el apoyo, los consejos, el tiempo y la libertad de conocimiento, fue grato haber trabajado a su lado.

A mis revisoras la Dra. Yvonne Ducolomb y la Dra. Edith Arenas por sus valiosas contribuciones, consejos y comentarios que enriquecieron en mucho esta investigación.

Gracias a la Dra. Zayil Zalazar por todo el apoyo técnico, sus contribuciones y comentarios para la mejora de este proyecto y por aceptar ser miembro del jurado, fue un honor trabajar con usted.

Al Dr. Mario Altamirano por el apoyo y la aceptación para formar parte del jurado.

A MVZ. Trinidad Sierra Guzmán, por el apoyo técnico y las vistas al rastro.

A la Lic. Veronica Cruz Taumori por todo el apoyo técnico y las charlas.

Al Dr. Miguel Betancourt por el apoyo.

Al M.BRA. Mario Teteltitla y a la M. B.E. Diana Flores por el apoyo técnico.

A los laboratorios de Biología Molecular S-032, Laboratorio Expresión Génica S-248. Biología Celular y Citometría S-255, y al Laboratorio de fisiología y diferenciación del espermatozoide S-257, a todos ellos muchas gracias por el apoyo técnico.

Mil gracias a todos y cada uno de los doctores que han forjado mi formación durante esta etapa de mi vida.

A la UAM por brindarme la oportunidad de ser parte de esta gran institución y hacer del conocimiento siempre una casa abierta al tiempo.

Miembros del Jurado de Examen

Los miembros del jurado designado por la División de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes aprobaron la Tesis titulada “**Efecto del Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS) en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos y su repercusión en la fertilización y el desarrollo embrionario**”

PRESIDENTE

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular S-252

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

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: duco@xanum.uam.mx

SECRETARIO

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

VOCAL

Edith Arenas Ríos

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida S-232

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: editharenas2000@yahoo.com.mx

VOCAL

Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos

Laboratorio de Expresión Génica S-248

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: zayil.salazar@xanum.uam.mx

Dedicatorias

En memoria de mis abuelos Narcisa Prieto, Lucia Ponce y Pedro García, gracias por ser mi ejemplo de perseverancia y lucha constante hasta en el último suspiro, aunque ya no estén conmigo en cuerpo lo estarán por siempre en pensamiento los amo.

A mis padres Margarita García y Enrique Salomón por todo su amor, apoyo y confianza que me han brindado, sin ellos no hubiera sido posible alcanzar la meta. Gracias por enseñarme que un camino trazado sobre la dedicación, la perseverancia, la entrega y el sacrificio valen la pena, los amo.

A Marco Guerrero por ser la persona que impulsa en mí, la ambición de superación cada día, Te amo.

Con todo mi amor a mi hijo Esteban Guerrero, por ser el motor que impulsa todo mi ser, gracias por llegar en el momento correcto, Te amo.

A mis hermanos Luis y Narciso por su apoyo.

A todos los miembros de mi familia de quienes siempre recibí un suspiro de aliento, que me hizo retomar nuevamente el camino.

Con cariño y gran admiración para la Mtra. Ángeles Aguilar, gracias por ser un ejemplo de disciplina y profesionalismo, pero sobre todo por su sincera amistad.

A Tomás Ibarra, amigo te quiero mucho, gracias por las tardes de café, charla y por todo tu apoyo que me brindaste, en verdad te estoy muy agradecida, eres un ser humano increíble.

Gracias Paco García por tu sincera amistad y los buenos momentos.

A Elizabeth Silva, por siempre brindarme una palabra de aliento y por su sincera amistad, gracias por ser mi fan.

A Alejandro Domínguez, gracias por el apoyo técnico, tus acertadas contribuciones para mejorar mi tesis y sobre todo por tu gran amistad, eres un ser valioso.

Al Dr. Humberto González, gracias por su amistad, críticas y por todo el apoyo que me ha brindado.

Índice

RESUMEN	VI
ABSTRACT.....	VIII
ABREVIATURAS	X
INTRODUCCIÓN	1
EL OVARIO: OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS	1
EL OVOCITO	7
MADURACIÓN DEL OVOCITO	7
CÉLULAS DE LA GRANULOSA EN LA MADURACIÓN	9
FERTILIZACIÓN EN MAMÍFEROS	9
SEGMENTACIÓN	10
XENOTÓXICO	11
COMPUESTOS PERFLUORADOS (PFCS).....	11
SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS).....	13
ANTECEDENTES	14
JUSTIFICACIÓN.....	17
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
MATERIAL Y MÉTODO.....	19
MADURACIÓN IN VITRO (MIV) DE OVOCITOS PORCINOS.....	19
EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y LA MADURACIÓN.....	20
FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i> (FIV) DE OVOCITOS PORCINOS.....	22
EVALUACIÓN DE LA FIV	23
EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	24
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	25
RESULTADOS.....	26
EFECTO DEL DMSO EN LA VIABILIDAD Y LA MADURACIÓN DE OVOCITOS EXPUESTOS DURANTE LA MIV (44 h)	26

EFFECTO DEL PFOS EN LA VIABILIDAD Y LA MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS EXPUESTOS DURANTE LA MIV	28
EFFECTO DEL DMSO Y DE LAS CONCENTRACIONES SUBLETALES DEL PFOS SOBRE LA VIABILIDAD Y LA FIV EN OVOCITOS EXPUESTOS DURANTE LA MIV	30
EFFECTO DEL DMSO Y DE LAS CONCENTRACIONES SUBLETALES DEL PFOS SOBRE EL DE EN OVOCITOS EXPUESTOS DURANTE LA MIV	36
DISCUSIÓN	38
EFFECTO DEL DMSO EN OVOCITOS PORCINOS EXPUESTOS DURANTE LA MIV	39
(44 H), SOBRE LA VIABILIDAD, LA MADURACIÓN NUCLEAR, LA FIV Y EL DE	39
EFFECTO DEL PFOS EN OVOCITOS PORCINOS EXPUESTOS DURANTE LA MIV	39
(44 H) SOBRE LA VIABILIDAD Y LA MADURACIÓN NUCLEAR	39
EFFECTO DEL PFOS EN LA FIV, EN OVOCITOS EXPUESTOS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DURANTE LA MIV	42
EFFECTO DE CONCENTRACIONES SUBLETALES DEL PFOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN OVOCITOS EXPUESTO DURANTE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>	44
CONCLUSIÓN	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Resumen

El PFOS es un compuesto perfluorado ampliamente utilizado en la industria, la medicina y en productos de consumo. En estudios *in vivo* la presencia del PFOS en concentraciones relevantes en diversos fluidos biológicos se ha relacionado con daños en la funcionalidad y el desarrollo del tracto reproductor, tanto en hembras como en machos. Sin embargo, es escasa la información del efecto del PFOS en los gametos, en especial en las hembras, ya que no hay reportes sobre la exposición de los ovocitos durante la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario. Por ello la importancia de realizar estudios *in vitro* utilizando como modelo al porcino, pues comparte ciertas características fisiológicas y anatómicas con los seres humanos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del PFOS en la viabilidad, la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario *in vitro*, en ovocitos expuesto durante la maduración, de tal manera que esto pueda ser un factor de riesgo para la salud reproductiva de la hembra.

Los resultados obtenidos en este estudio de maduración *in vitro* demuestran que la viabilidad es afectada en un 50% a una concentración de 31 μM , mientras que la maduración es inhibida, en la misma proporción, a una concentración de 9 μM . Esto indica que la maduración puede ser afectada a una menor concentración con respecto a la concentración que se requiere para matar al ovocito, por lo que la inhibición de la maduración se debe a la presencia del PFOS por 44 h de cultivo y no por la muerte de la célula.

Por otro lado, al evaluar el efecto del PFOS en la formación de pronúcleos ocurrida 18 h después de la maduración de ovocitos expuestos a concentraciones subletales (2, 4 y 8 μM), se observó que los porcentajes de fertilización en cada uno de los tratamientos no se afectó. Se propone que los resultados pueden deberse a que el efecto provocado por la exposición de los ovocitos al PFOS quizá sea reversible. Asimismo, los porcentajes de desarrollo embrionario obtenidos indicaron que la

exposición de ovocitos al PFOS durante su maduración no influye en el desarrollo embrionario. Por lo tanto, la MIV es un proceso que puede verse inhibido o retrasado por la presencia del PFOS en el medio de cultivo, sin embargo, al ser retirado el tóxico, los ovocitos recuperan la capacidad para reanudar la meiosis, esto indica que el efecto inducido sobre este proceso puede ser reversible, siempre y cuando se considere la dosis, el tiempo de exposición, y la especie entre otros factores que son cruciales para las células.

Abstract

PFOS is a perfluorinated compound widely used in industry, medicine and consumer products. In vivo studies in the presence of PFOS relevant concentrations in various biological fluids it has been linked to damage to the functionality and the development of the reproductive tract in both females and males. However, there is little information on the effect of PFOS in the gametes, especially in females, since there are no reports of exposure during oocyte maturation, fertilization and embryo development. Hence the importance of in vitro studies using pigs as a model, he shares certain physiological and anatomical characteristics with humans

The aim of this study was to evaluate the effect of PFOS on viability, maturation, fertilization and embryo development in vitro, in oocytes exposed during maturation, so this may be a risk factor for reproductive health the female.

The results obtained in this study show that in vitro maturation is affected viability by 50% at a concentration of 31 μ M, while maturation is inhibited in proportion to a concentration of 9mM. This indicates that the ripening can be affected at a lower concentration compared to the concentration required to kill the oocyte, thus inhibiting the ripening is due to the presence of PFOS by 44 hours of culture rather than death cell.

Furthermore, to evaluate the effect of PFOS in forming pronuclei occurred 18 h post maturation of oocytes exposed to sublethal concentrations (2, 4 and 8 μ M), it was observed that the percentages of fertilization in each of the treatments It was not affected. It is proposed that the results may be due to the effect caused by exposure of oocytes to PFOS may be reversible.

Also, the percentage of embryonic development obtained indicated that exposure to PFOS during oocyte maturation does not affect embryonic development.

Therefore, the MIV is a process that can be inhibited or delayed by the presence of PFOS in the culture medium, however, upon removal toxic, oocytes regain the ability to resume meiosis, this indicates that the effect induced this process may be reversible as long as the dose, exposure time, and the species and other factors that are crucial for the cells is considered.

Abreviaturas

AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
BSA	Albúmina sérica bovina
CG	Células de la granulosa
CIM₅₀	Concentración de Inhibición de la Maduración 50
CL₅₀	Concentración Letal 50
CP	Cuerpo polar
COCs	Complejo ovocito-células del cúmulo
COPs	Compuestos orgánicos persistentes
CT	Células de la teca
DE	Desarrollo embrionario
DMSO	Dimetilsulfóxido
E₂	Estradiol
FF	Fluido folicular
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GC	Gránulos corticales
GVBD	Rompimiento de vesícula germinal
Hoechst	Bisbenzimidaz H3342 tihidroclorado
LH	Hormona luteinizante
MIV	Maduración <i>in vitro</i>
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MTT	Metil-tiazil-difenil-tetrazolio
n	Célula haploide
2n	Célula diploide
PN	Pronúcleo
PFCs	Compuestos perfluorados
PFOS	Sulfonato de Perfluorooctano
PFHxS	Sulfonato de Perfluorohexano
PFOA	Ácido Perfluorooctanoico
PFDA	Ácido Perfluorodecanoico
RNA	Ácido ribonucleico
T	Testosterona
VG	Vesícula germinal
ZP	Zona pelúcida

Introducción

En 1990, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que había 42 millones de parejas infértiles; para el 2010 la cifra se incrementó a 48.5 millones, es decir, entre el 5 y el 15% de las parejas en edad reproductiva son infértiles, de las cuales entre el 10 y el 20% se desconocen las causas de este padecimiento. Sin embargo, se han obtenido datos relacionados con causas multifactoriales, entre ellas alteraciones ambientales. Debido a que diversos compuestos de origen químico han alterado las condiciones normales del ambiente y por lo tanto la homeostasis de los organismos; es por lo que la salud reproductiva ha ganado gran importancia en la investigación. Estos compuestos químicos se denominan compuestos xenotóxicos, y un ejemplo de ellos son los compuestos perfluorados (PFC), sustancias compuestas de flúor y carbono utilizadas para la producción de diversos materiales de uso industrial, alimenticio y médico, las cuales, son responsables de alteraciones cromosómicas, disfunciones endocrinas (Nordström *et al.*, 2009) y problemas de fertilidad (Governini *et al.*, 2011). Por ello la importancia de estudiar las repercusiones en la fertilización y el desarrollo embrionario en gametos expuestos a estos compuestos durante la maduración. En este trabajo se propone utilizar como modelo al porcino, ya que algunas de las funciones anatómicas y fisiológicas son parecidas a las del humano (Santos *et al.*, 2014).

El ovario: ovogénesis y foliculogénesis

El ovario es el órgano reproductor en las hembras y es responsable de producir y almacenar ovocitos, así como también de la secreción balanceada de ciertas hormonas esteroides (estrógenos, progesterona y andrógenos) y peptídicas (relaxina, inhibina y activina), los cuales intervienen en el desarrollo del tracto reproductor, la

maduración de los gametos, la fertilización, la implantación y el desarrollo embrionario (Botella, 1995; Hafez y Hafez, 2000).

Los ovarios son órganos pares, cuya forma es ovalada, se localizan suspendidos en la cavidad abdominal, sostenidos por tejido conectivo, y miden aproximadamente 3 cm de diámetro en la mujer y de 4 a 5 cm en la cerda (Hafez y Hafez, 2000; Trejo *et al.*, 2005). En el ovario se pueden identificar: la región interior que se denomina *médula* y está constituida por tejido conectivo, vasos sanguíneos y linfáticos, músculo liso y fibras nerviosas; y la región exterior *corteza*, es donde se sitúa a los folículos que contienen en su interior a las células de la teca, la granulosa y al ovocito (**Fig. 1**) (Trejo *et al.*, 2005). En el ovario se forman y maduran los ovocitos mediante los procesos de ovogénesis y foliculogénesis.

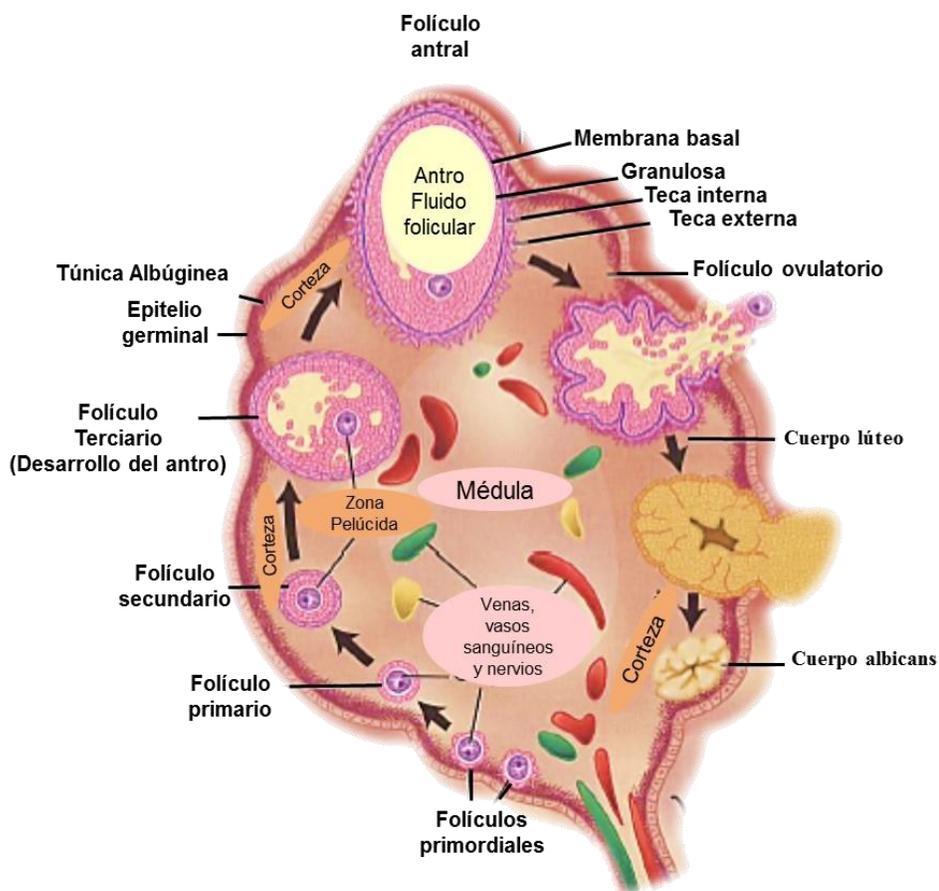


Figura 1. Componentes del ovario y diferentes estadios de maduración del folículo.

La *ovogénesis* inicia en la etapa embrionaria, durante este período, las células germinales primordiales proliferan por mitosis para producir las ovogonias que son células diploides ($2n$). Al momento del nacimiento, el desarrollo y el crecimiento de las ovogonias se ve interrumpido por lo que dejan de proliferar y un número de folículos se pierde mediante atresia, de tal manera que al llegar a la etapa pre púber se cuenta ya con un número reducido de ovocitos.

La *foliculogénesis*, comprende procesos de diferenciación, crecimiento y desarrollo del folículo para la producción de gametos y hormonas esteroides. El folículo es el compartimiento ovárico en el que se encuentra contenido el ovocito, embebido en el fluido folicular (FF), producto de la transferencia de los constituyentes del plasma sanguíneo y el metabolismo de las células de la granulosa (CG) y la teca (CT), que le provee de nutrientes y constituye el microambiente del ovocito durante la maduración folicular, en donde se experimentan cinco etapas de crecimiento: folículo primordial, primario, secundario, antral y preovulatorio (König y Liebich, 2008). Estos procesos se ven concluidos en el momento de la ovulación, que es regulada por el eje de retroalimentación hipotálamo- hipófisis- ovario (Trejo *et al.*, 2005).

Durante las primeras etapas de desarrollo folicular el control de crecimiento es regulado por mecanismos intraováricos, posteriormente depende de señales hormonales, producidas por la hipófisis (Hafez y Hafez, 2000).

Las ovogonias inicialmente se encuentran cubiertas por una capa de CG alargadas, las cuales en etapas subsecuentes de desarrollo experimentan cambios morfológicos y bioquímicos que permitirán el desarrollo y supervivencia del ovocito (Young y McNeilly, 2010), ya que posteriormente ambos sufrirán cambios morfológicos y metabólicos para dar origen a los ovocitos primarios; en este momento el folículo es denominado *primordial*. Estos folículos comienzan a crecer y los ovocitos entran en meiosis, donde experimentan el primer arresto meiótico, y el ovocito queda detenido en Profase I en etapa de diploteno; en este momento ocurre la condensación de la cromatina para la formación de los cromosomas con dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero (Clift y Schuh, 2013).

La etapa de diploteno se divide en cinco estadios *leptoteno*, *cigoteno*, *paquiteno* (se caracteriza por el entrecruzamiento en donde los cromosomas se aparean produciéndose un intercambio de segmentos, lo que origina la variabilidad genética entre los individuos), *diploteno*, (etapa en la que el ovocito queda arrestado) y *diacinesis*, en esta etapa meiótica el ovocito se encuentra en el estado conocido como vesícula germinal (VG) ya que todavía es visible la envoltura nuclear, la cual desaparece en la prometáfase. Hasta este momento, el ovocito que ha sido reclutado para crecer y madurar es primario y su folículo es primordial. (Trejo *et al.*, 2005).

En la etapa de folículo primario, hay una gran actividad proliferativa de las células de la granulosa cuya morfología ahora ya es cuboidal, mientras que en el ovocito ocurren cambios estructurales, por ejemplo, la zona pelúcida (ZP) es evidente y a través de ella se emiten prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa para el intercambio de metabolitos con el ovocito, de tal manera que esto le proporciona la maquinaria necesaria para madurar y crecer. Finalmente, durante esta etapa se conforma el complejo ovocito-células del cúmulo (COCs), el cual consta del ovocito, la ZP, las células de la granulosa cuboide y de la corona (Young and McNeilly., 2010).

La ZP juega un papel muy importante durante la fertilización y el desarrollo embrionario, pues actúa como una barrera para evitar la polispermia y la entrada de espermatozoides de otra especie, también brinda protección al embrión, ya que sin ella los blastómeros serían degradados y por último ayuda a la implantación del mismo en el útero (Yanagimachi, 1994).

El proceso de diferenciación y proliferación descrito anteriormente es indispensable para la progresión de la meiosis, el incremento de tamaño y la acumulación de sustancias de reserva e incluso RNA mensajero, el cual, es vital para la síntesis de proteínas y enzimas requeridas para el desarrollo embrionario. Es en este momento que será considerado como folículo secundario dependiente de la actividad de las gonadotrofinas: Hormona luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH), por su parte las células foliculares proliferan y disponen de una red

capilar que nutre al folículo, en tanto que el ovocito primario ha obtenido su tamaño óptimo (Hafez y Hafez, 2000; Trejo *et al.*, 2005).

El folículo terciario depende de la acción de FSH y LH sintetizadas y liberadas al inicio de la pubertad para el desarrollo y función del folículo, durante esta etapa las células foliculares proliferan, pero dejan de crecer para formar el antro, que es un espacio lleno de líquido folicular localizado entre las células de la granulosa y la teca (Young and McNeilly, 2010).

Así, el folículo resultante contiene un ovocito con todas las células accesorias que soportan su desarrollo y supervivencia. En esta etapa de crecimiento, diferenciación y proliferación se tiene un folículo antral, el cual contiene al ovocito secundario, que ha reanudado la meiosis, pasando por la Metafase I (MI) y II (MII) (extrusión del primer cuerpo polar (CP), momento en el cual la célula ya es haploide (n) y nuevamente queda arrestado. Si ocurre la fertilización, la meiosis se reanuda y completa, restaurando con ello el número cromosómico, se extruye el segundo cuerpo polar e inicia la formación de pronúcleos (Clift and Schuh, 2013; Trejo *et al.*, 2005).

En la MI, los cromosomas homólogos se alinean en el ecuador de la célula, asociados a los filamentos de huso acrosómico para migrar hacia los polos durante la anafase I; en la telofase I, los cromosomas llegan a los polos y se produce la división celular con reconstitución de envolturas nucleares correspondientes a cada juego de cromosomas. Finalmente, el número cromosómico se ha reducido a la mitad, sin embargo, cada uno de ellos conserva las dos cromátidas hermanas y se han formado dos células a partir de una sola. Inmediatamente después ocurre otra división celular, pero sin duplicar el material genético: la meiosis II, proceso en el que nuevamente se repiten, a excepción de la profase, las etapas antes mencionadas, pero con la diferencia de que las cromátidas hermanas unidas al centrómero se alinean en el ecuador de la célula. Al ser fertilizado se lleva a cabo la telofase II, y se libera el segundo cuerpo polar. Como producto de la división meiótica se producen cuatro gametos haploides, de los cuales únicamente uno, el ovocito será viable (**Fig.2**).

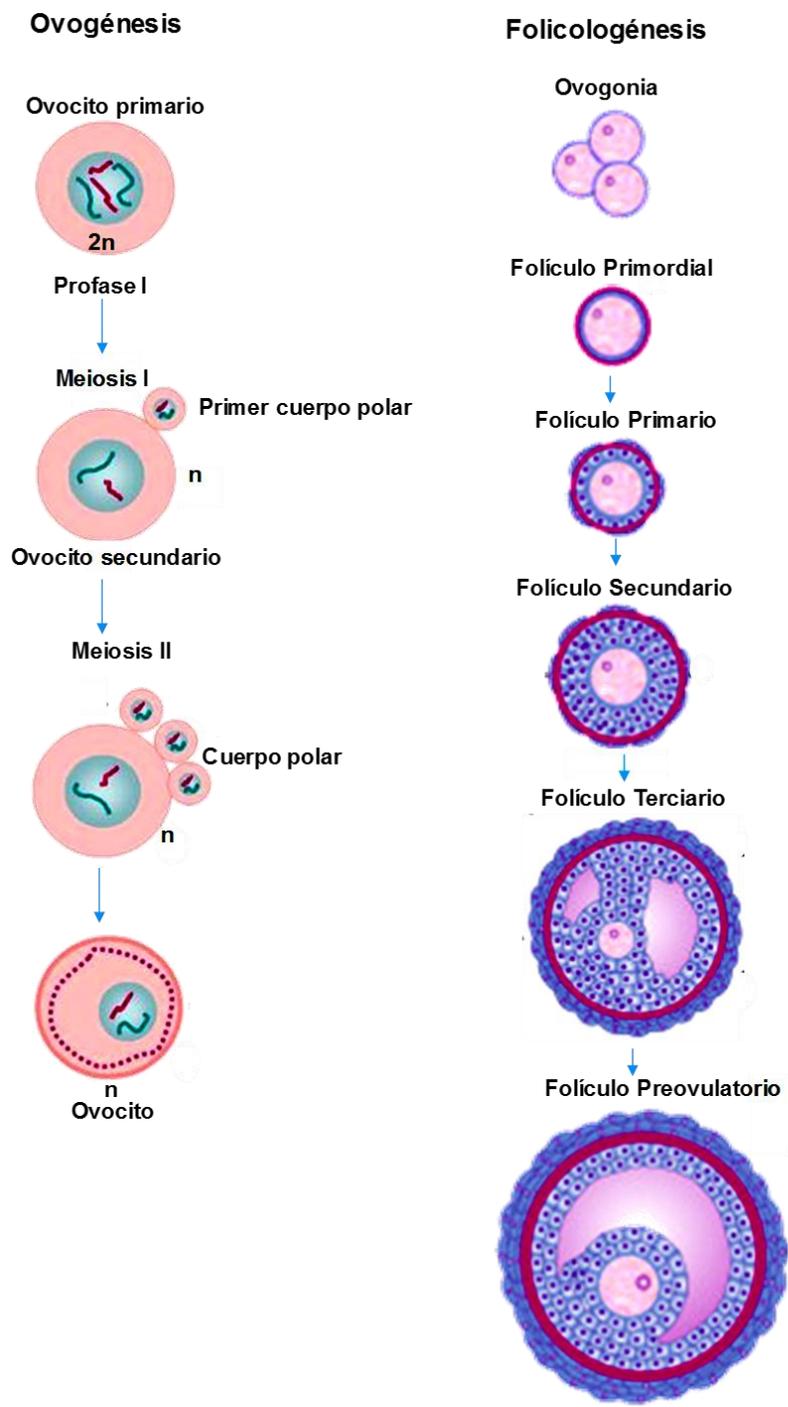


Figura 2. Proceso de diferenciación del folículo y formación y reducción del número cromosómico en el ovocito

El ovocito

El ovocito es una célula reproductora haploide altamente especializada, de forma esférica, en la que, tanto el tamaño como el contenido varía según la especie, debido a que contiene grandes cantidades de sustancias de reserva para mantener el desarrollo embrionario; el ovocito se encuentra rodeado por la ZP, las células de la granulosa y las células de la teca. En su interior se distinguen, entre otras estructuras, el citoplasma y el núcleo, ambos experimentan un proceso de maduración durante su crecimiento, que es indispensable para que el ovocito pueda ser fertilizado y hasta entonces ser considerado como: *óvulo*, es necesario que durante su maduración sucedan cambios tanto en el interior como en el exterior del mismo (Betancourt *et al.*, 2003; Trejo *et al.*, 2005).

Para que el ovocito pueda llegar a ser un óvulo o pueda ser fertilizado, deben suceder en el ovocito dos procesos previos: *la maduración nuclear y la maduración citoplasmática*, las cuales son de vital importancia y se llevan a cabo durante el crecimiento del ovocito.

Maduración del ovocito

La maduración *nuclear y citoplasmática* en el ovocito, involucra procesos complejos que ocurren durante el crecimiento folicular y concluyen al ocurrir la fertilización; es regulada por una serie de factores celulares y moleculares, que involucran cambios en el núcleo, el citoplasma y la membrana, así como en los niveles plasmáticos de las gonadotropinas, los cuales, son importantes para que ocurra la formación de un nuevo individuo.

La maduración *nuclear* se caracteriza por estados alternados de desarrollo y de arresto de la meiosis. El primer arresto meiótico es el denominado VG, término empleado para referirse al núcleo del ovocito inmaduro. Durante el crecimiento del

ovocito y en respuesta al estímulo gonadotrófico preovulatorio durante la pubertad se reinicia la meiosis y se rompe la envoltura nuclear (GVBD), ocurre la formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean al huso, alcanzando el estadio de MI, posteriormente viene la segregación de los cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del primer CP y el paso al estadio de MII, etapa en la cual el ovocito es arrestado por segunda vez y ovulado de esta forma, cabe señalar que durante este proceso no hay replicación de los cromosomas pero si duplicación de centriolos, la membrana nuclear desaparece y se forma el huso. La MII puede ser reanudada al ser fertilizado o activado partenogénicamente, completándose de esta manera la meiosis, con la extrusión del segundo CP (Betancourt *et al.*, 2003; Eppig 1993; Trejo *et al.*, 2005) (**Fig. 3**).

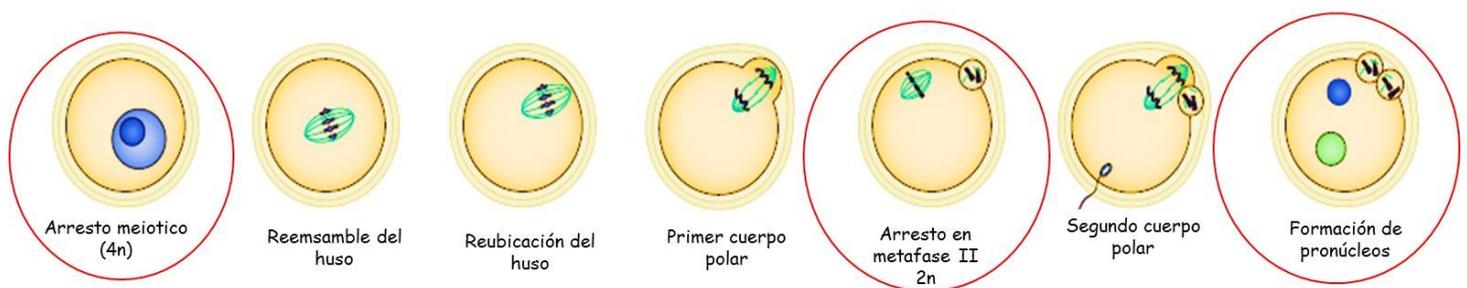


Figura 3. Reinicio, arresto y termino de la meiosis.

La FSH y la LH por su parte, juegan un papel muy importante para la reanudación de la meiosis. En el caso de la LH, aumenta la concentración de AMPc, el cual es producido y transferido por las células de la granulosa a través de las uniones comunicantes (*gap*) al ovocito y es responsable del arresto meiótico.

En cambio, la FSH promueve la expansión de las células del cúmulus, a través de la síntesis de piruvato y ácido hialurónico, los cuales, se ha sugerido que podría participar en el bloqueo de la polispermia durante la fecundación, a través de la síntesis previa de los gránulos corticales (Betancourt *et al.*, 2003; Mehlmann *et al.*, 2005).

Células de la granulosa en la maduración

Las células de la granulosa posiblemente se originaron del epitelio del mesotelio o del *rete ovarii*. Estas presentan diferentes fenotipos dependiendo su localización dentro del folículo y debido a que se encuentran separadas por la lámina basal, no reciben suministro sanguíneo, y por lo tanto el paso de leucocitos y sustancias de alto peso molecular queda restringido. Los fenotipos de células de la granulosa son: *murales*, *antrales* y del *cúmulus*, todas tienen la capacidad de responder a LH y FSH y son responsables del intercambio de nutrientes entre el ovocito y el exterior (Yen y Jeffer, 2009).

Fertilización en mamíferos

La fertilización es un proceso complejo, que implica el desarrollo y la maduración tanto del espermatozoide como del ovocito, seguido de la migración de los espermatozoides hasta el oviducto e interacción con él ovocito, para que finalmente se fusionen espermatozoide-ovocito mediante la formación de pronúcleos para dar origen a un individuo genéticamente diferente (Okabe et al., 2013).

El proceso de activación del ovocito ocurre al unirse el espermatozoide, lo que provoca una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos. Los parámetros que indican que un ovocito es activado son: el reinicio de la MII de la meiosis, la formación del segundo CP y la excreción de los gránulos corticales (GC). Se considera que un ovocito es fertilizado sí el espermatozoide está dentro de la ZP o del ooplasma, hay formación de pronúcleos o bien la presencia de diferentes estadios celulares (Yanagimachi, 1994).

Antes de interaccionar y unirse los gametos, el espermatozoide capacitado atraviesa las células del cúmulo y cruza la ZP. El acrosoma del espermatozoide contiene varias enzimas proteolíticas, hialuronidasa y β -galactosidasa entre otras, que

degradan a la ZP para que pueda unirse al ovocito. Posteriormente, el espermatozoide cruza rápidamente el espacio perivitelino, de tal manera que la membrana interna del acrosoma de la región ecuatorial se fusiona introduciéndolo al citoplasma del óvulo, inmediatamente después se reinicia la división meiótica, para la formación y la fusión de los pronúcleos femenino y masculino, así como la liberación del segundo cuerpo polar, proceso que es denominado *singamia* (Trejo *et al.*, 2005; Yanagimachi, 1994).

En este proceso la subdivisión subsecuente que se lleva a cabo en el cigoto es solo de la masa citoplasmática, dando lugar a la *segmentación* (Trejo *et al.*, 2005; Jiménez-Castellanos *et al.*, 2007).

Segmentación

Durante la segmentación, ocurren una serie de divisiones, hasta generar una célula de 16 blastómeros; la primera división da lugar a dos células, cada una de las cuales da lugar a otras dos, de tal manera que se llega a una fase, en la cual, el huevo se transforma en un conglomerado de células que recibe el nombre de *mórula* (Jiménez-Castellanos *et al.*, 2007).

La mórula continúa su multiplicación de manera geométrica, en tanto que la zona pelúcida se empieza a disolver y la masa total del embrión empieza a incrementar de volumen. Si el proceso continúa, las células se arreglan en una capa redonda, y se forma el blastocisto con un centro hueco lleno de líquido, el blastocele. Posteriormente ocurre la diferenciación de las células con la aparición de una masa de células en un polo del blastocisto que formará los tejidos embrionarios, mientras que la zona principal y opuesta dará origen a la masa embrionaria de las células de la placenta, denominada trofoblasto.

Los procesos previamente descritos se pueden ver comprometidos de manera reversible e irreversible por la interacción de diversos compuestos tóxicos con proteínas, que son indispensables para su diferenciación, crecimiento y desarrollo, por ello la importancia de estudiar el efecto de un xenotóxico durante la MIV y su repercusión en la FIV y el DE en un modelo *in vitro*.

Xenotóxico

En la actualidad diversos compuestos químicos sintéticos (xenotóxicos) han sido detectados en el suero de humanos, en organismos de vida silvestre, y en el medio ambiente, afectando de esta manera las funciones reproductivas de las especies a nivel global. Los Compuestos Perfluorados (PFCs) son xenotóxicos de uso indiscriminado, a los que se les ha considerado como disruptores endocrinos que influyen sobre los efectos androgénicos y estrogénicos, a partir de la interacción con el receptor, el metabolismo y la producción hormonal o en la señalización del eje de regulación hipotálamo-hipófisis-ovario (Joensen *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2007).

La maduración del ovocito y la fertilización del mismo son procesos susceptibles de daños provocados por el ambiente o productos xenotóxicos como sucede con los PFCs.

Compuestos Perfluorados (PFCs)

Los compuestos perfluorados (PFCs), son sustancias químicas sintéticas producidas por el hombre o bien por el metabolismo de otros productos químicos perfluorados. La producción de PFCs inicio en 1950 por la empresa estadounidense 3M (Fei *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2003; Seacat *et al.*, 2002).

Los PFCs están formados por una cadena variable de átomos de carbono (C4-C14), unidos mediante un enlace covalente polar a átomos de flúor, el cual es sumamente estable en forma unida y un grupo funcional terminal carboxilo o sulfonato, debido a sus características físico-químicas se consideran anfipáticos, y son compuestos orgánicos persistentes (COPs) en el medio ambiente, pues tienen la característica de ser sumamente estables en el aire, presentar resistencia a altas temperaturas, y no son inflamables además, biodegradables por ácidos fuertes o agentes oxidantes (Inoue *et al.*, 2004; Halldorsson *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2004; Luebker *et al.*, 2002).

Sin embargo, debido a sus propiedades físico-químicas, han sido empleados en una amplia gama de aplicaciones industriales y de consumo; como por ejemplo para la producción de componentes adhesivos, cosméticos, revestimientos de papel, retardantes de fuego, agentes tenso activos, lubricantes e insecticidas, destacándose incluso en prendas de vestir, cuero y tapicería, así como en protectores de papel para el empleo de alimentos envasados, además de bolsas, platos y envolturas (Austin *et al.*, 2003; Joensen *et al.*, 2013).

De acuerdo a su composición química los PFCS se dividen en dos grupos: los sulfonatos de Perfluoroalquilo dentro de los cuales se encuentra el sulfonato de perfluorohexano (PFHxS) y el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y los carboxilatos de perfluoroalquilo como el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y el ácido perfluorodecanoico (PFDA).

Desde el punto de vista toxicológico, la importancia de estos compuestos perfluorados radica en que son bioacumulables y generan toxicidad ocasionando efectos adversos a la salud de los seres humanos, especies de vida silvestre y alteran el medio ambiente, ya que estudios al respecto, mencionan que pueden ser carcinogénicos; afectando a la gónada (Joensen *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2007), al sistema endocrino y a las uniones comunicantes (Domínguez, 2014; Hu *et al.*, 2002; Upham *et al.*, 1998), lo que provoca un incremento o disminución de las hormonas esteroides e inmunotoxicidad durante el desarrollo, además de hepatotoxicidad y daño

mitocondrial (Shi *et al.*, 2007). Los PFC parecen estar vinculados con alteraciones reproductivas, tal es el caso de la maduración de gametos y la fertilización, así como el desarrollo embrionario y neonatal (Austin *et al.*, 2003; Domínguez, 2015; Fei *et al.*, 2007; Governini *et al.*, 2011; Teteltitla, 2014). Un ejemplo de estos compuestos es el Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS), que en exposiciones *in vivo* en diversas especies de laboratorio altera el sistema neuroendocrino, el ciclo reproductivo y el desarrollo neonatal (Lau *et al.*, 2004; Nordström *et al.*, 2009).

Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS)

El PFOS ($C_8F_{17}SO_3$) es un componente orgánico perfluorado constituido por una cadena de ocho átomos de carbono unidos cada uno a un átomo de flúor con un grupo funcional sulfonato (SO_2O). Pertenece a la familia de los perfluoroalquilo sulfonatos y es un líquido volátil a temperatura y presión normal; sin embargo, tiene baja volatilidad y presión (**Fig.4**). La producción de este compuesto se realiza mediante la fluoración y telomerización eléctrica. PFOS actúa como un agente tenso activo, el cual tiene propiedades reductoras de tensión superficial elevada, debido a estas características, es ampliamente utilizado en aplicaciones industriales y de consumo (Austin *et al.*, 2003; Fei *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2004).

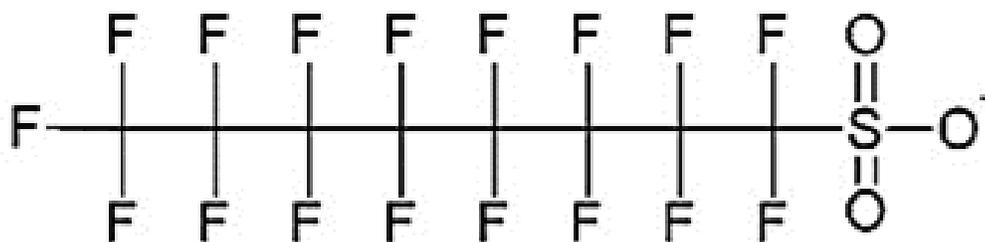


Figura 4. Estructura del PFOS.

En el ambiente se han determinado concentraciones del PFOS en el agua dulce, en mamíferos marinos, peces, aves y mariscos, incluso en lugares como el Ártico, el Pacífico y Océano Norte, siendo las regiones más pobladas e industriales las que presentan mayores concentraciones e incluso se han detectado concentraciones importantes en alimentos y en el polvo de casa habitación (Lau *et al.*, 2004).

La presencia del PFOS en diversos fluidos biológicos y órganos a nivel global en seres humanos y en la vida silvestre ha generado interés ya que se une a proteínas de plasma como la albúmina y tiene afinidad por la subunidad β de las lipoproteínas y a fracciones de la globulina α y γ , así como a la transferrina y a la hormona transportadora de hormonas esteroideas (SHGB), desplazando de esta manera a la testosterona (T) y estradiol (E_2) además de competir por el mismo sitio de unión de los ácidos grasos (Jensen y Leffers, 2008; Zhao *et al.*, 2010). Por lo anterior, se absorbe fácilmente, y se distribuye en el plasma a través de la circulación enterohepática y no se elimina completamente a través de la orina y las heces; además se secreta durante la lactancia a través de la leche (Whitworth *et al.*, 2012; Reiner *et al.*, 2009).

Antecedentes

Estudios *in vivo* e *in vitro* en animales, han demostrado que el PFOS altera la homeostasis de los individuos expuestos. Su distribución es principalmente extracelular; en plasma de rata, mono y humano se reportan concentraciones en un rango de 1 a 500 mg/mL, en el líquido amniótico 1 ng/mL reportado en, la leche materna y la orina se han determinado 1 ng/mL, en tanto que en el tejido mamario de los descendientes fue de 1.0 ng/g y una concentración menor a 11 ng/mL en el cordón umbilical, mientras que en individuos ocupacionalmente expuesto se reporta de 9.930 a 12.830 ng/mL (Olsen *et al.*, 2007; Reiner *et al.*, 2009).

Son varios los estudios que reportan el efecto del PFOS en organismos expuestos. En primates, por ejemplo, la exposición a 0.75 mg/kg/día de PFOS provocó la disminución del peso corporal, bajos niveles de colesterol total y de triyodotironina, y un aumento en la concentración de estradiol, así como el peso del hígado (Seacat *et al.*, 2002). En cambio, en el mono *Rhesus* la exposición al perfluorado redujo la concentración de lípidos y del peso corporal, produciéndose un alto índice de mortalidad, debido a la acumulación del compuesto (Butenhoff *et al.*, 2009; Johnson *et al.*: 1979; Goldenthal *et al.*, 1978; Seacat *et al.*, 2002).

Cuando se evaluó el efecto del PFOS en monos *Cynomolgus*, durante la exposición no se observaron cambios en la proliferación celular hepática, en el páncreas o en los testículos (Changa *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2007). Aunque otras fuentes mencionan que exposiciones subcrónicas en monos, ratas, peces y seres humanos condujo a la pérdida de peso corporal acompañado de hepatotoxicidad y una reducción en los niveles de hormonas tiroideas, de colesterol, de triglicéridos y en algunos individuos produce la muerte (Joensen *et al.*, 2013; Seacat *et al.*, 2002).

Por otro lado, en relación con el sistema reproductor, se ha visto que los compuestos perfluorados son uno de los factores que influyen en la disminución de la fertilidad en humanos, desconociéndose los mecanismos biológicos por los que actúan, aunque se relacionan con alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (disruptor endocrino), que a su vez pueden causar ciclos irregulares y retraso en la ovulación así como disminución de la capacidad fecundante de ovocitos y de embriones transferidos (Austin *et al.*, 2003; Governini *et al.*, 2011).

En estudios enfocados al efecto reproductivo del PFOS, en ratas expuestas a una dosis de 3.028 y 15.489 mg/kg, demostraron que conforme incrementa el tiempo de exposición y las dosis del compuesto, disminuyen la ingesta de alimento, los niveles circulantes de leptina en suero y reduce el número de implantaciones así como de embriones viables, además de incrementar los niveles de corticoesterona en plasma y

alterar el sistema neuroendocrino, mientras que a dosis bajas no se observaron cambios (Austin *et al.*, 2003; Reiner *et al.*, 2009).

En rata también, la exposición durante 42 días antes del apareamiento y durante la gestación redujo la viabilidad de las crías y el crecimiento postnatal, incluso a dosis bajas (Butenhoff *et al.*, 2009). Las concentraciones reportadas en el plasma materno son de 6.4 a 106.7 ng/mL, misma que disminuye conforme la edad gestacional, la paridad y la lactación, esto debido a que la concentración de la albumina desciende durante la gestación y la expansión de volumen sanguíneo (Fei *et al.*, 2007). La evaluación en dos generaciones de ratas expuestas a dosis altas produjo una alta mortalidad en la descendencia de la F₁, mientras que en la F₂ produjo la pérdida de peso (Hinderliter *et al.*, 2005).

Estudios teratogénicos realizados en rata, ratón y conejo demuestran que provoca una disminución en el peso fetal, induce fisura palatina, edema, retrasa la osificación de los huesos y la apertura prematura de los ojos, así como anomalías cardíacas y falta de apetito en las hembras gestantes e incluso una alta mortalidad de las crías que sobrevivieron a dosis bajas (Specht *et al.*, 2012). Además, el PFOS podría estar vinculado con el retraso en la maduración pulmonar fetal y en el desarrollo de la glándula mamaria, ya que tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria (Austin *et al.*, 2003; Butenhoff *et al.*, 2009; Longnecker *et al.*, 2008; Specht *et al.*, 2012). Además, se ha reportado una dosis-respuesta positiva asociada con los niveles de leptina, insulina y la relación leptina-insulina e inversamente con los niveles de adiponectina (Halldorsson *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que altas concentraciones del PFOS repercuten sobre la funcionalidad de las células de Leydig y la morfología del testículo (Shi *et al.*, 2007).

Justificación

Se ha demostrado que el PFOS se encuentra en concentraciones relevantes en diversos fluidos biológicos y es responsable de daños en la funcionalidad y desarrollo del sistema reproductor en estudios *in vivo*, sin embargo, es escasa la información sobre lo que estos compuestos pueden causar sobre la maduración de gametos, la fertilización y el desarrollo embrionario.

Pregunta de investigación

¿Afectará la presencia del PFOS durante el período de maduración *in vitro* de ovocitos porcinos el proceso de maduración y la subsecuente fertilización y desarrollo embrionario?

Hipótesis

Si el cultivo de los COCs en presencia del PFOS altera el proceso de maduración *in vitro*, entonces su efecto repercutirá sobre la fertilización y desarrollo embrionario.

Objetivo general

Evaluar el efecto del PFOS durante el período de maduración *in vitro* y su repercusión sobre la fertilización y el desarrollo embrionario.

Objetivos particulares

- Determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀) y la Concentración de la Inhibición de la Maduración 50 (CIM₅₀) del PFOS en ovocitos porcinos expuestos durante el período de maduración *in vitro*.
- Evaluar la FIV en ovocitos madurados en presencia del PFOS en concentraciones subletales (< CIM₅₀).
- Evaluar el desarrollo embrionario de ovocitos porcinos expuestos durante el período de maduración *in vitro* a diferentes concentraciones del PFOS menores a la CIM₅₀.

Material y Método

Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos porcinos

Todos los reactivos empleados fueron de la marca Sigma Chemical Co. (EUA), al menos de que se especifique lo contrario.

Las técnicas de cultivo y maduración *in vitro* de ovocitos porcinos utilizadas fueron las descritas por Yoshida *et al* (1990).

Se utilizaron ovarios de cerdas pre púberes de aproximadamente 6 meses de edad, sacrificadas en el rastro (Los Arcos, Edo. México). Los ovarios fueron transportados al laboratorio en una solución de NaCl al 0.9%, a una temperatura de entre 25-28°C. Al llegar al laboratorio en un lapso no mayor a 2 h, de los ovarios se puncionaron sólo aquellos folículos que medían entre 3 y 6 mm para obtener el fluido folicular que contenía el complejo ovocitos-células del cúmulo (COCs), usando para esto una aguja de calibre 18 fijada a una jeringa desechable de 10 mL. El fluido folicular colectado se dejó sedimentar por 20 min en un tubo de 50 mL. El botón celular se lavó en dos tiempos de 15 min cada uno, en donde se agregaron 20 ml de la solución de Tyrode suplementada con 10 mM de lactato de sodio 0.50 mM HEPES y 0.01 % de polivinil alcohol (TL-HEPES PVA) a un pH de 7.3 a 7.4.

El botón celular fue resuspendido y colocado en cajas Petri para su colecta, en donde los COCs seleccionados fueron aquellos que presentaban un citoplasma uniforme y cuando menos tres capas de células del cúmulo, se lavaron tres veces para restirar restos celulares en 500 µL en medio TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (In vitro, México) suplementado (glucosa 3 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, alcohol polivinilico 0.1% (v/v), cisteína 0.57 mM, EGF 10 ng/mL, penicilina 75 µg/mL, estreptomycin 1 µg/mL, y fueron cultivados en una caja de 4 pozos (Nunc, Dinamarca) con medio comercial TCM-199 suplementado (medio de cultivo) y con FSH 5 µg/mL y LH 5 µg/mL, en esta etapa se colocó al PFOS a diferentes concentraciones 2 µM, 4

μM , $6.2 \mu\text{M}$, $8 \mu\text{M}$, $12.5 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$, el cual se encontraba en una solución stock de 20 mM disuelto en DMSO (99.5%).

Para probar el efecto del diluyente se empleó una concentración proporcional a las trabajadas con el compuesto perfluorado, los cuales fueron 0%, 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.06%, 0.12% y 0.24%. Además, fue empleado un control, el cual, sólo contenía medio de cultivo. En ambos casos los COCs fueron incubados por un período de 44 h a 38.5°C , en una atmósfera de 5 % de CO_2 y humedad a saturación.

Evaluación de la viabilidad y la maduración

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se empleó la técnica de doble tinción para evaluar de manera simultánea en el ovocito, la viabilidad (MTT, microscopía de campo claro) y la maduración nuclear (Hoechst, microscopía de epifluorescencia). Para esto, fueron retiradas las células del cúmulo y se agregó MTT (Azul de Tetrazolio, 5mg/mL en PBS), por un período de 30 minutos; con esta prueba se determinó la viabilidad de las células (ovocito incoloro: muerto; ovocito púrpura: vivo) (**Fig 5**).

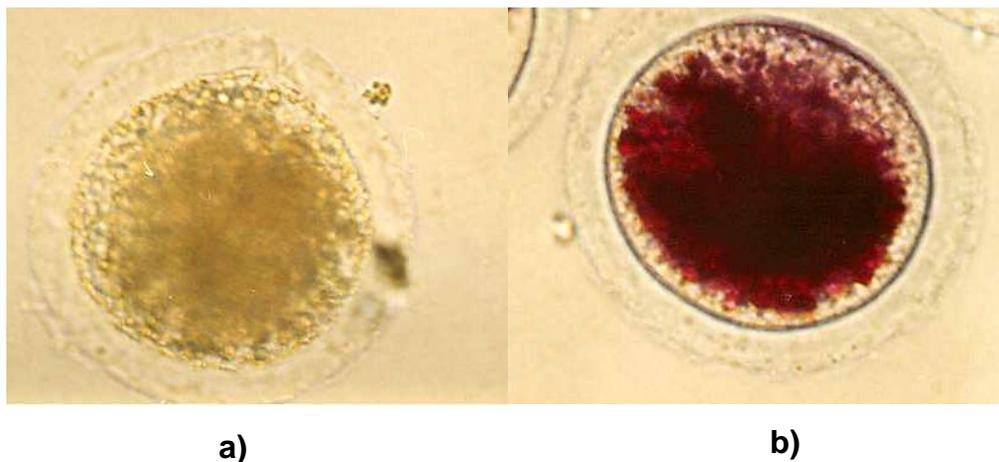


Figura 5. Ovocitos teñidos con MTT: a) incoloro: Muerto y b) Purpura: vivo.

Para evaluar la maduración nuclear, los ovocitos fueron teñidos con 45 $\mu\text{g/ml}$ de bisbenzimidida (Hoechst 33342 en PBS) aislados de la luz, por 40 minutos, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 2% por 12 h y se colocaron en un portaobjetos con Glicerol-PBS (1:9). El estado de maduración se evaluó con el siguiente criterio: los ovocitos en vesícula germinal se consideraron como inmaduros, los ovocitos en Metafase I como ovocitos en vía de maduración y aquellos en Metafase II como ovocitos maduros (**Fig 6**).

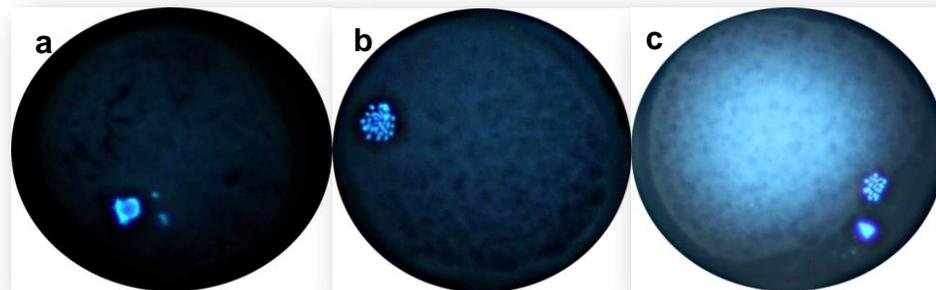


Figura 6. Ovocitos teñidos con Hoechst 33342: a) VG: Inmaduro, b) MI inmaduros y c) MII: Maduro.

Fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos porcinos

Después de la MIV, las células del cúmulo fueron removidas por acción mecánica para cada uno de los tratamientos (PFOS y DMSO) y posteriormente lavados en medio de fertilización TBM (Tris Buffer Medium), compuesto por NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 7.5 mM, Tris 20 mM, glucosa 11 mM, y piruvato de sodio 5 mM y adicionado con 0.4% de albúmina de suero bovino (BSA) y 2.5 mM benzoato de cafeína. Se colocaron 50 ovocitos aproximadamente, por tratamiento en cajas multipozos con 500 μL de medio TBM y cubiertos con aceite mineral.

Para realizar la FIV, se empleó una muestra de semen de una granja de inseminación porcina local; extraída mediante la técnica de mano enguantada. El semen fue diluido con un diluyente comercial (Vitasem) a 16°C, y transportada de 16-24°C en máximo 2 h.

De la muestra de semen se evaluó movilidad, cuyo valor mínimo fue del 80%. Se tomaron 5 mL de semen y se diluyó en 5 mL de DPBS (Dulbecco Phosphate Buffer Solution), suplementado (0.1 g/L CaCl_2 anhidro, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicilina, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina y 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) a un pH de 7.2. Esta suspensión, fue centrifugada tres veces: la primera, a 61 x g por 5 min, de la cual se tomaron 5 mL del sobrenadante y nuevamente fue centrifugada dos veces más a 1900 x g por 5 min, cada una con 5 mL y 10 mL de DPBS, respectivamente. El paquete celular se diluyó en 100 μL de TBM y posteriormente se realizó la cuenta espermática.

En una caja de 4 pozos se colocaron 50 ovocitos en TBM, para que posteriormente fueran agregados los espermatozoides cuya concentración final fue de 5×10^5 espermatozoides por mL, incubados durante 6 hr en las mismas condiciones que la MIV. Una vez transcurrido este tiempo, se lavaron e incubaron con medio de desarrollo embrionario NCSU-23 (North Carolina State University-23) suplementado con 0.4% BSA en un volumen de 500 μ L, respectivamente por 144 h. Finalmente se lavaron con PBS y tiñeron para evaluar viabilidad y formación de pronúcleos.

Evaluación de la FIV

El proceso de fertilización fue evaluado mediante la tinción con MTT y Hoechst, antes descrita. Para la evaluación de la fertilización se consideraron los siguientes criterios donde los ovocitos con un pronúcleo (PN) era considerados activados; con dos PN como cigoto y con tres o más PN, polispérmico (**Fig 7**).

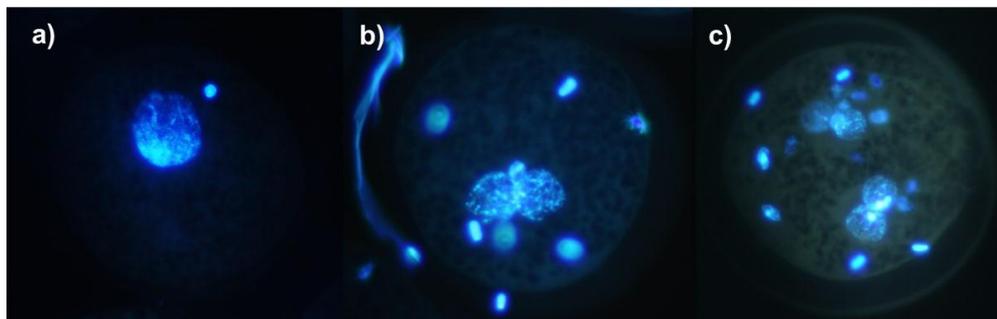


Figura 7. Cigotos teñidos con Hoechst: a) Activado, b) Fertilizado y c) Polispérmico

Evaluación del desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario fue evaluado bajo el microscopio invertido (Olympus Optical), después de transcurridas 192 h de la co-incubación. Se consideraron como divididos aquellos embriones que se encontraban en 2, 4, 8 y 16 blastómeros así como las mórulas, blastocistos y no divididos a los ovocitos madurados con presencia de un cuerpo polar (**Fig 8.**).

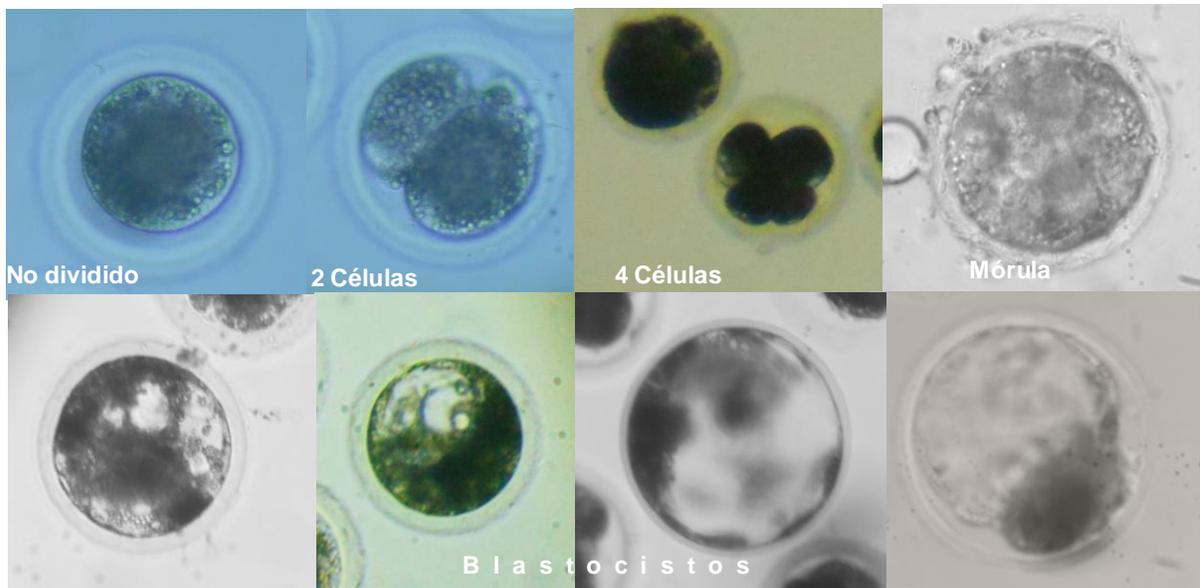


Figura 8. Evaluación morfológica del estado de los embriones y la división celular.

Análisis de Resultados

- La concentración letal 50 (CL₅₀) y la Concentración de la Inhibición de la Maduración 50 (CIM₅₀) se obtendrán a partir de una regresión no lineal.
- Para determinar el efecto de PFOS en la fertilización y el desarrollo embrionario se empleará el coeficiente de correlación de Spearman y ANOVA seguido de un análisis estadístico paramétrico de Tukey-Kramer.

Resultados

Efecto del DMSO en la viabilidad y la maduración de ovocitos expuestos durante la MIV (44 h)

Para evaluar el efecto del diluyente (DMSO) en ovocitos expuestos durante la MIV, se trabajó en el rango de concentraciones de 0 (control), 0.03, 0.06, 0.12 y 0.25% de DMSO equivalentes a las concentraciones de 0 (control), 6.2, 12.5, 25 y 50 μM del PFOS.

Los porcentajes de viabilidad fueron normalizados considerando al control como 100%. Las concentraciones de DMSO al 0.03, 0.06, 0.12 y 0.25% presentaron una viabilidad del 90, 96, 100 y 104% respectivamente. El Coeficiente de Correlación de Pearson indicó que ninguna de las concentraciones de DMSO tuvo efecto en la viabilidad de los ovocitos expuestos durante la MIV ($r=0.31$; $p>0.05$) (**Fig 9.**).

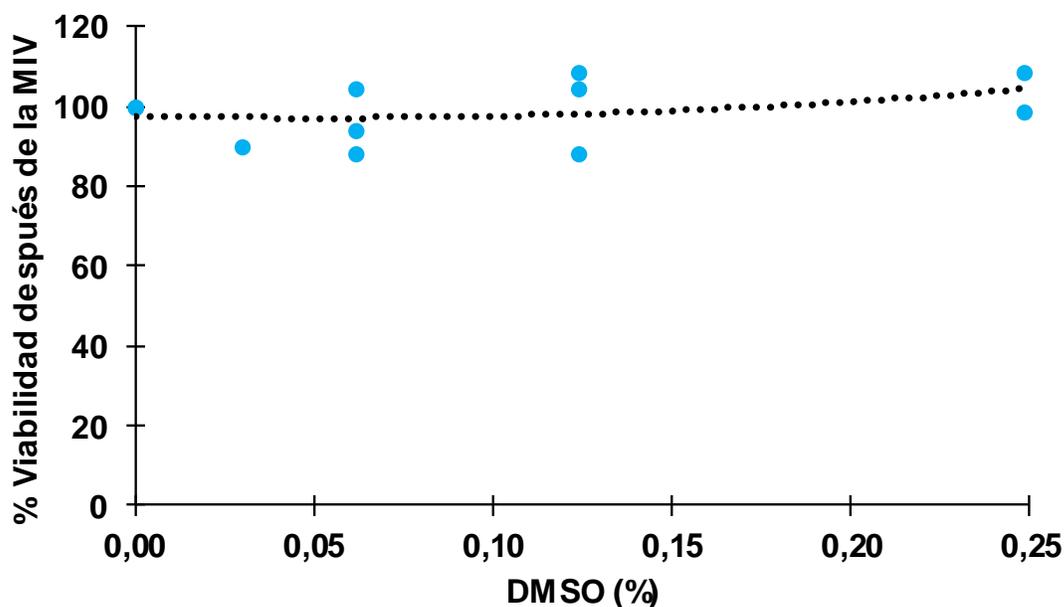


Figura 9. Efecto del diluyente en la viabilidad de los ovocitos expuestos durante 44 h. Los datos se presentan normalizados para cada ensayo, con una regresión no lineal (N=3 con 379 ovocitos en total; $r = 0.31$; $p > 0.05$).

El diluyente no afectó el proceso de maduración en los ovocitos expuestos durante la MIV en las diferentes concentraciones utilizadas. Los porcentajes de maduración fueron 100, 145, 96, 101 y 86% para el control y las concentraciones de 0.03, 0.06, 0.12 y 0.25% de DMSO, respectivamente. El Coeficiente de Correlación de Pearson reveló que no se presentó una respuesta concentración-dependiente en la maduración con el tratamiento de DMSO ($r = -0.24$; $p < 0.05$) (**Fig 10.**).

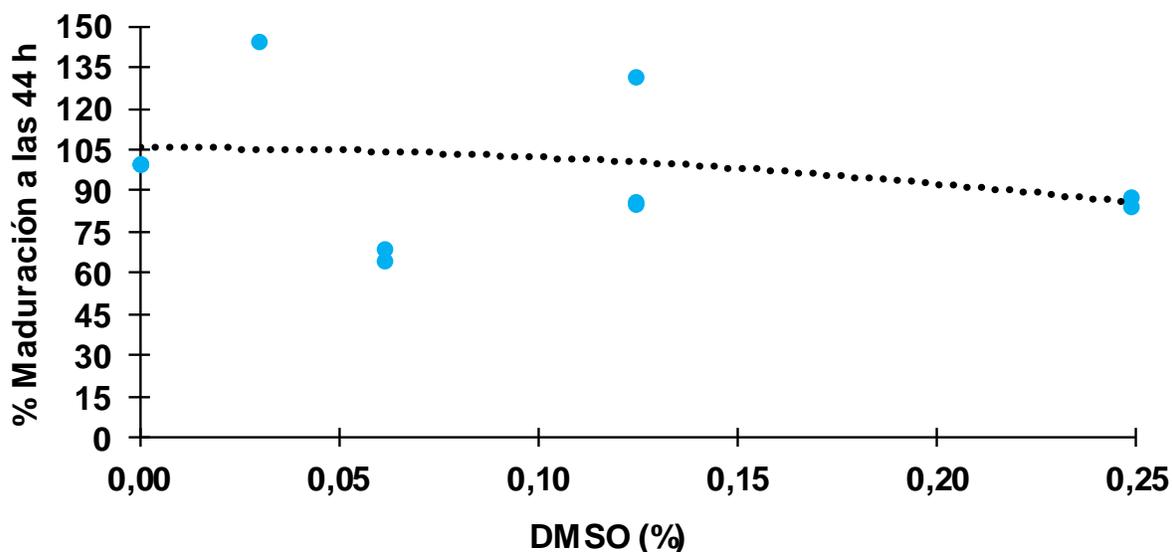


Figura 10. Efecto del diluyente en la maduración de ovocitos expuestos durante 44 h. Los datos se presentan normalizados para cada ensayo, con una regresión no lineal (N=3 con 379 ovocitos en total; $r = -0.24$; $p < 0.05$).

Efecto del PFOS en la viabilidad y la maduración de los ovocitos expuestos durante la MIV

Las concentraciones que se trabajaron para determinar la CL_{50} y la CIM_{50} fueron: 0, 6.2, 12.5, 25 y 50 μM y cuando menos para cada tratamiento se realizó por duplicado. El promedio de los porcentajes de viabilidad del control fue normalizado al 100%. En las concentraciones de 6.2, 12.5, 25 y 50 μM del PFOS los porcentajes fueron 122, 103, 61 y 0% respectivamente.

La CL_{50} fue de 31 μM del PFOS. Se observó que conforme se incrementó la concentración, conforme disminuyó el porcentaje de ovocitos viables. El Coeficiente de Correlación de Pearson mostró una respuesta concentración-dependiente ($r = -0.63$; $p < 0.05$). La prueba de ANOVA indicó diferencias significativas entre las concentraciones de 25 y 50 μM con respecto al control (**Fig 11.**).

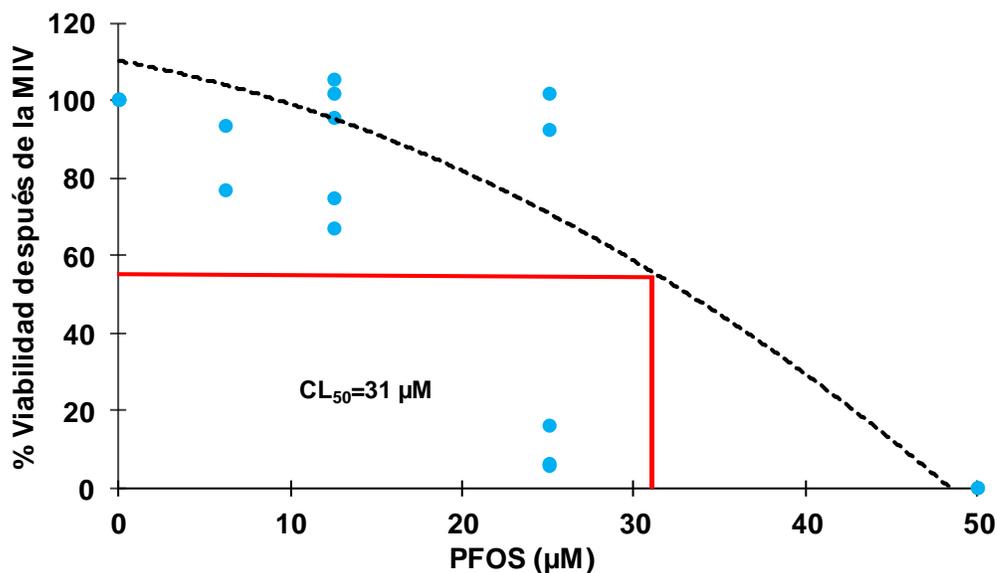


Figura 11. Efecto del PFOS en la viabilidad de los ovocitos expuestos durante el período de maduración (44 h). La viabilidad es afectada a una concentración de $CL_{50}=31 \mu\text{M}$. Los datos se muestran normalizados, con una $N=6$ con 476 ovocitos en total; $r = -0.63$; $p < 0.05$

La maduración de los ovocitos expuestos al PFOS, disminuyó de manera concentración-dependiente conforme se incrementó la concentración.

Los porcentajes de maduración fueron 100, 61, 31, 4 y 0% al emplear las concentraciones de PFOS de 6.2, 12.5, 25 y 50 μM respectivamente. El Coeficiente de Correlación de Pearson indicó una relación entre el incremento de la concentración y la disminución en los porcentajes de maduración ($r = -0,83$; $p < 0.05$).

La ecuación del gráfico determinó la CIM_{50} que fue de 9 μM . La prueba de ANOVA indicó, que las concentraciones de 25 y 50 μM mostraron diferencias significativas con respecto al control, entre ellas y con el resto de las concentraciones empleadas (**Fig 12.**).

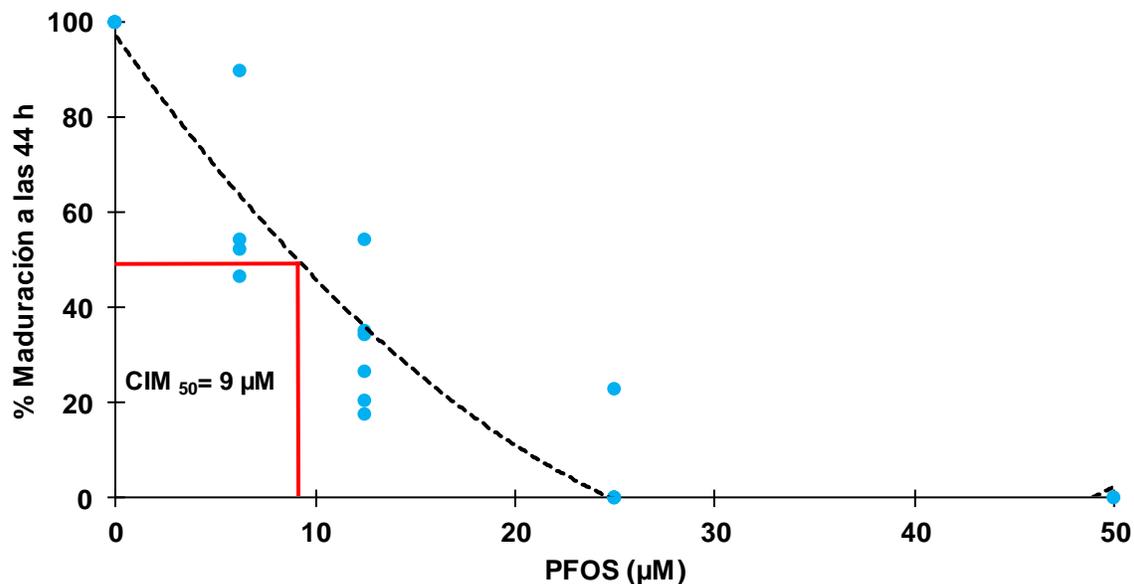


Figura 12. Efecto del PFOS en la maduración de ovocitos expuestos durante 44 h. La CIM_{50} fue de 9 μM . Los datos se presentan normalizados, con una $N=6$ con un total de 476 ovocitos $r = -0.83$; $p < 0.05$.

Efecto del DMSO y de las concentraciones subletales del PFOS sobre la viabilidad y la FIV en ovocitos expuestos durante la MIV

Para evaluar el efecto del DMSO sobre la FIV se utilizaron concentraciones subletales que corresponden a las empleadas como diluyente cuando se determinó el efecto del PFOS (2, 4 y 8 μM) en la FIV.

Las concentraciones de DMSO utilizadas fueron 0, 0.01, 0.02 y 0.04%. El promedio de los porcentajes de viabilidad de los cigotos en el grupo control fueron normalizados al 100%. En todas las concentraciones se observó el 100% de viabilidad. Por lo que se determinó que el DMSO no afectó este parámetro a las 62 h de incubación.

La Correlación de Pearson indicó que no hubo una relación entre la concentración de PFOS y la viabilidad de los cigotos ($r= 0.00$; $p<0.05$) (**Fig 13.**).

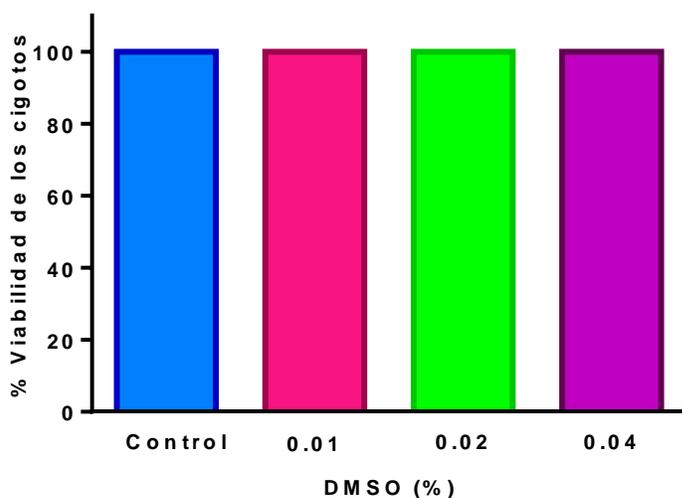


Figura 13. Efecto del diluyente en la viabilidad de los cigotos 18 h después de haber retirado el DMSO. Los ovocitos sólo fueron expuestos al diluyente durante las 44 h de MIV y posteriormente fueron fertilizados. Los datos se presentan normalizados (N=4; $r= 0.00$, con un total de 282 ovocitos evaluados en total; $p<0.05$).

Los porcentajes de FIV evaluados 18 h después post-incubación, no disminuyeron en ninguna de las concentraciones del diluyente con respecto al control. El promedio de los porcentajes de formación de pronúcleos fueron 100, 101, 88 y 100, respectivamente para cada una de las concentraciones antes mencionadas. La correlación de Pearson no indicó una relación concentración-dependiente ($r = -0.05$; $p < 0.05$, Fig 14.).

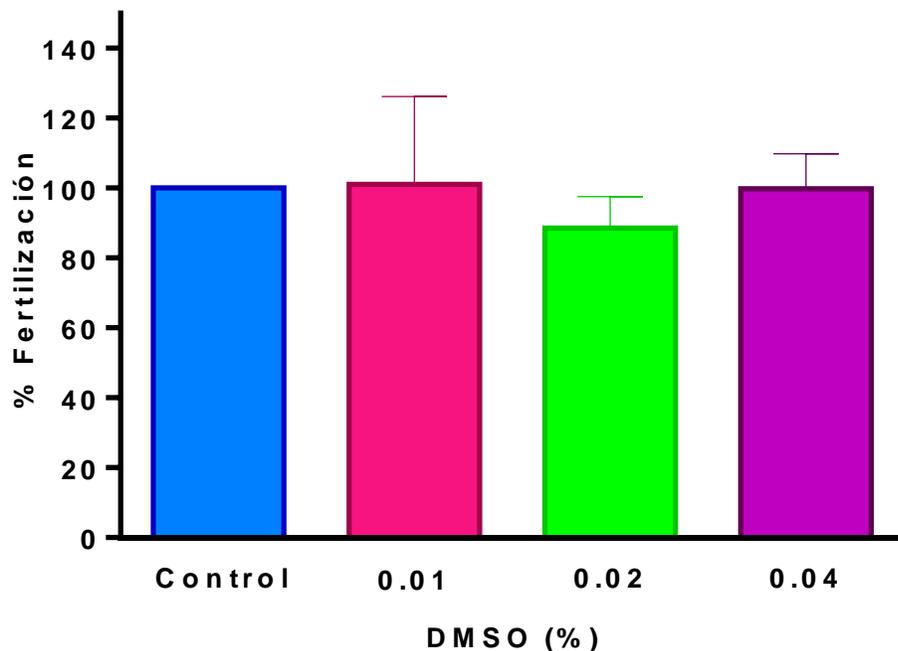


Figura 14. Efecto del DMSO en el porcentaje de cigotos, en ovocitos expuestos durante la MIV (44 h), (N=4; con un total de 282 ovocitos evaluados; $r = -0.05$; $p < 0.05$). Los datos se presentan normalizados.

Con la finalidad de observar si el diluyente modificaba los porcentajes de maduración 18 h post-inseminación se evaluaron los porcentajes de cigotos y de ovocitos en MII.

El DMSO no afectó los porcentajes de ovocitos madurados después de las 62 h de incubación. Los porcentajes de ovocitos madurados fueron 100, 102, 90 y 96% para las concentraciones de 0, 0.01, 0.02 y 0.04% de DMSO respectivamente. La Correlación de Pearson no indicó una relación con la concentración y el porcentaje de ovocitos maduros ($r = -0.35$; $p < 0.05$, **Fig 15.**).

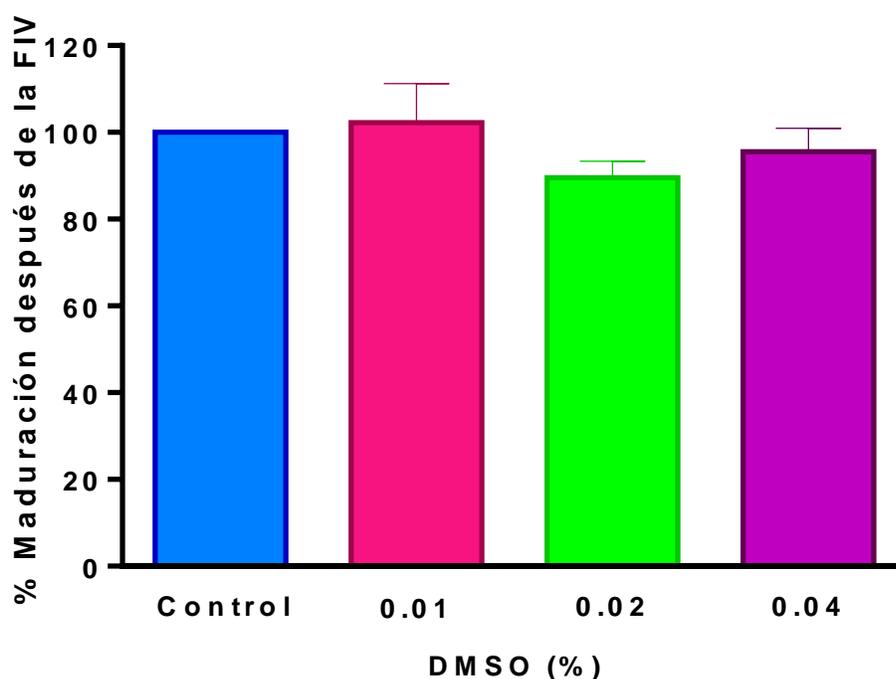


Figura 15. Efecto del DMSO en el número de ovocitos madurados, expuestos durante la MIV al diluyente. (N=4; con 282 ovocitos evaluados en total; $r = -0.35$; $p < 0.05$). Los datos se presentan normalizados.

Las concentraciones del PFOS utilizadas para evaluar el efecto en la FIV fueron 0, 2,4 y 8 μM . Para ello se evaluó en el cigoto de manera simultánea la viabilidad y la formación de pronúcleos (FIV) en ovocitos expuestos durante la MIV.

El PFOS no afectó los porcentajes de viabilidad en los cigotos a las 62 h de incubación, de las cuales sólo 44 h corresponden a la exposición al PFOS en el medio de cultivo a concentraciones subletales de 2, 4 y 8 μM .

El promedio de los porcentajes de viabilidad para cada una de las concentraciones (0, 2, 4, y 8 μM) fueron 100, 82, 92 y 96% respectivamente. La Correlación de Pearson no indicó una relación entre las concentraciones y con respecto al control ($r = -0.14$; $p < 0.05$, **Fig 16**).

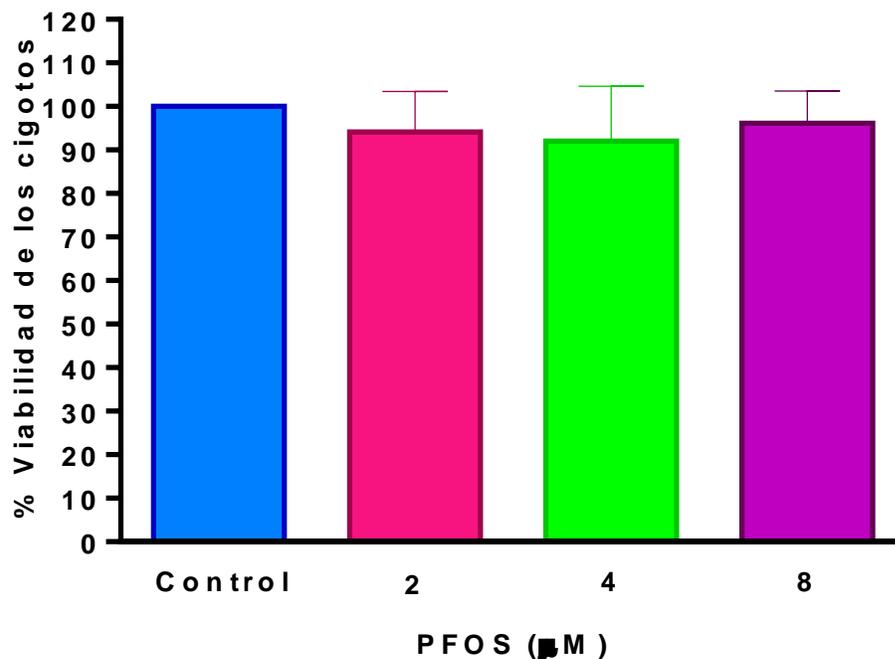


Figura 16. Efecto del PFOS en la viabilidad de los cigotos, de ovocitos expuestos en la MIV. Los datos se muestran normalizados (N=8, con 710 cigotos evaluados en total; $r = -0.14$; $p < 0.05$).

En la fertilización los resultados obtenidos del PFOS indicaron que el número de cigotos no fue afectado por las concentraciones subletales empleadas, en ovocitos

expuestos durante la MIV. La correlación de Pearson, no indicó una relación entre las concentraciones del PFOS y el número de cigotos obtenido ($r= 0.05$; $p<0.05$, **Fig 17.**).

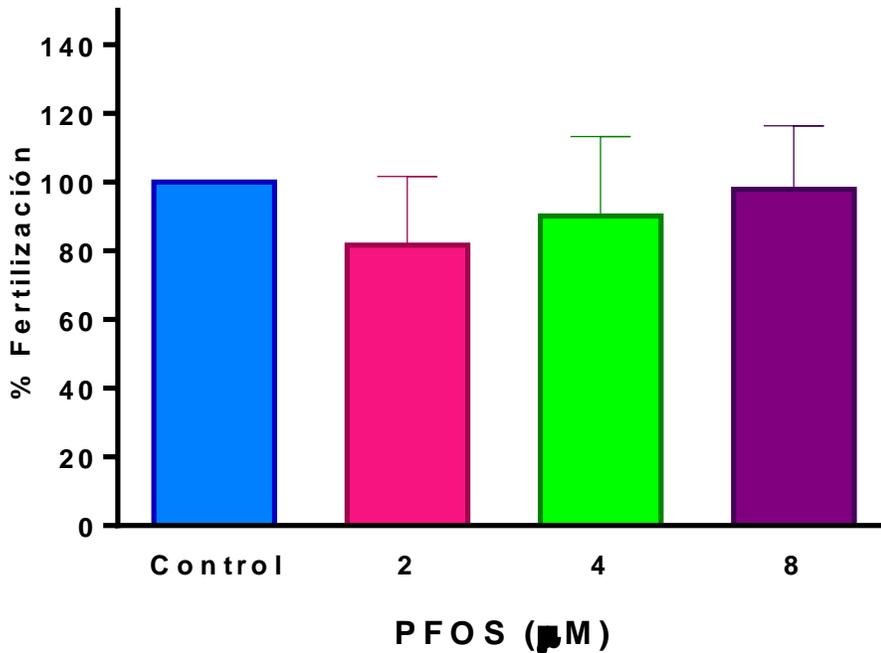


Figura 17. Efecto del PFOS en la formación de pronúcleos, en ovocitos expuestos en la MIV. Los datos se muestran normalizados (N=8; con 710 cigotos en total; $r= 0.05$; $p<0.05$).

Los porcentajes de maduración (ovocitos en MII + fertilizados) fueron evaluados a las 62 h durante el análisis de la FIV. El PFOS modificó los porcentajes de maduración después de 62 h de incubación.

La maduración a las 62 h en las concentraciones de 0, 2, 4 y 8 μM fue de 100, 86, 81 y 97% respectivamente. La correlación de Pearson no indicó diferencias

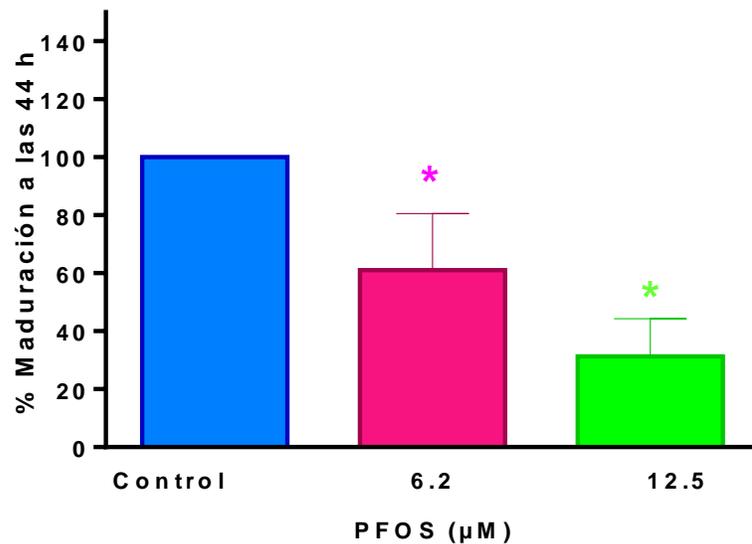


Figura 18. Efecto del PFOS en la maduración evaluada a las 44 h. Los datos se muestran normalizados (N=6; con 322 ovocitos en total $r = -0.93$; $p < 0.05$).

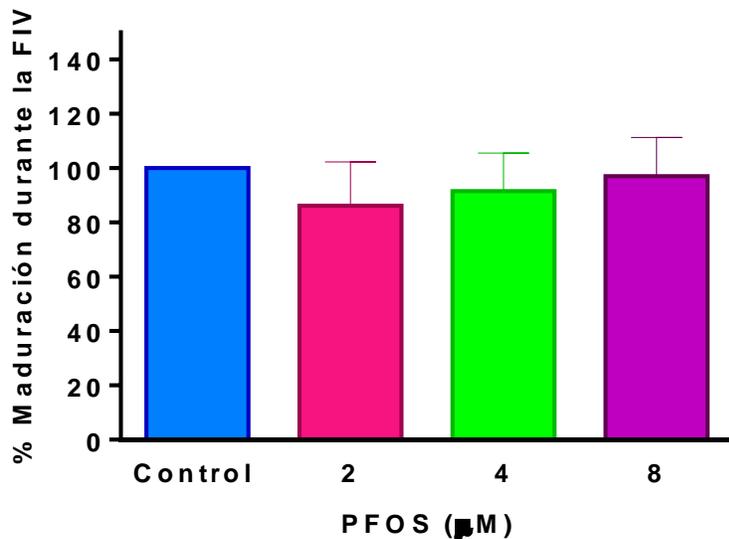


Figura 19. Efecto del PFOS en la maduración evaluada después de la FIV (18 h). El PFOS no estuvo presente en la FIV. Los datos se muestran normalizados (N=8; con 710 cigotos en total $r = -0.02$; $p < 0.05$).

Efecto del DMSO y de las concentraciones subletales del PFOS sobre el DE en ovocitos expuestos durante la MIV

Para evaluar el efecto del DMSO y del PFOS en el DE, se utilizaron las concentraciones subletales empleadas anteriormente.

El promedio de los porcentajes de DE en el grupo control fueron 100, 133, 111 y 124% respectivamente. La Correlación de Pearson no indicó diferencias significativas entre las concentraciones y con respecto al control en los divididos ($r= 0.11$; $p>0.05$) (**Fig 20.**).

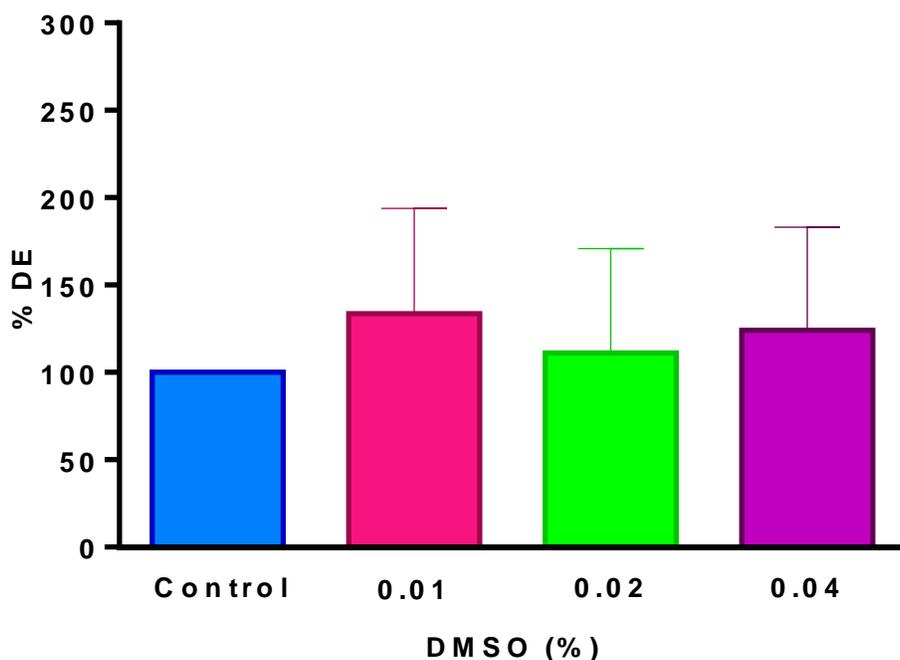


Figura 20. Efecto del DMSO en el porcentaje de embriones obtenidos, de ovocitos expuestos al diluyente en la MIV (N=5; 460 ovocitos evaluados en total $r= 0.11$; $p>0.05$). Los datos se muestran normalizados.

En la figura 21 se muestra que la exposición de los ovocitos al PFOS durante la maduración no afectó el porcentaje de embriones. El Coeficiente de Correlación de Pearson no indicó diferencias significativas entre las concentraciones y con respecto al control ($r= 0.02$ ($p<0.05$)).

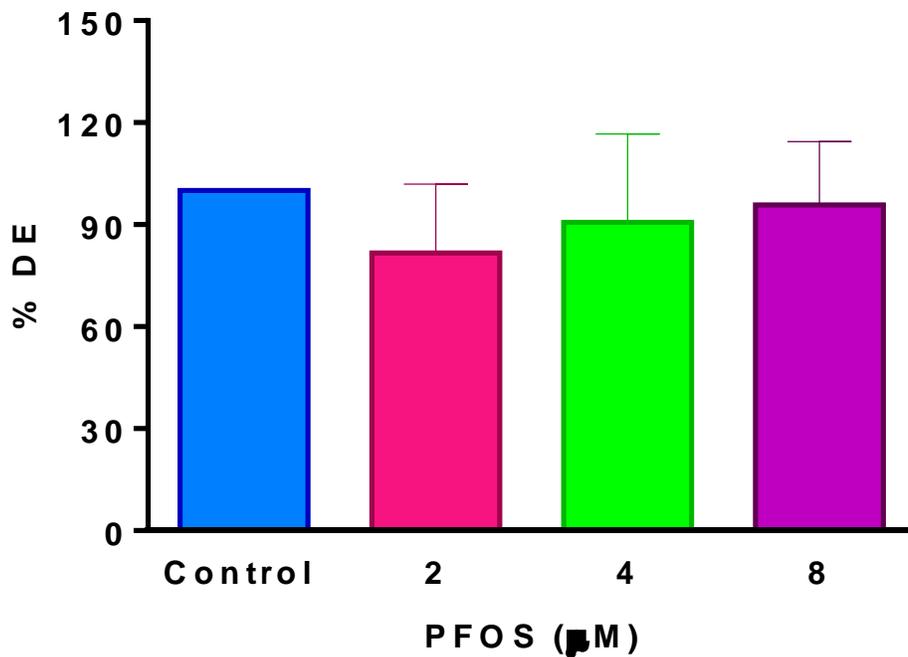


Figura 21. Efecto del PFOS en el número de embriones obtenidos, de ovocitos expuestos al PFOS en la MIV (N=6; con 735 ovocitos en total ($r= 0.02$; $p<0.05$)). Los datos se muestran normalizados.

Discusión

La presencia de diversos compuestos xenotóxicos en el ambiente han alterado la salud reproductiva de los organismos provocando infertilidad o subfertilidad, tanto en humanos como en animales de vida silvestre (Vélez *et al.*, 2015; Whitworth *et al.*, 2012) lo cual repercute sobre la maduración de los gametos, la fertilización, el desarrollo embrionario (Governini *et al.*, 2011; Reiner, *et al.*, 2009) y el crecimiento de las crías (Fei *et al.*, 2007). Por ello la importancia de estudiar el efecto de uno de los PFCs más ampliamente utilizado en la industria y presente en el ambiente. El PFOS ha sido cuantificado en diversos fluidos y su presencia está relacionada con alteraciones neuroendocrinas y citotoxicidad celular. El efecto o daño provocado en los organismos depende de la especie, la edad, la concentración, el sexo, y el tiempo de exposición, así como también de las técnicas empleadas para evaluar el efecto.

Se ha documentado que la presencia del PFOS o de los PFCs es relevante en el fluido folicular, ya que a una concentración de 0.015 y 0.03 μM respectivamente, ocasiona problemas de fertilidad, pues compromete el desarrollo del ovocito y por ende la capacidad de este para lograr un embrión viable. Estos hallazgos han sido reportados en mujeres de países desarrollados, donde la exposición a diversos compuestos xenotóxicos es alta (Governini *et al.*, 2011; Petro *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados hasta este momento concernientes a la maduración de gametos en hembras son controversiales, pues no existen más estudios *in vitro* con los cuales puedan ser comparados, aunque se ha visto que en mamíferos los PFCs alteran los niveles de hormonas esteroides, la maduración de los espermatozoides e influyen en la integridad del DNA (Joensen *et al.*, 2013; Nordström *et al.*, 2009).

En este caso el modelo *in vitro* permite conocer el impacto del PFOS en el ovocito, sin embargo, la respuesta obtenida *in vivo* puede ser diferente, debido a la interacción entre los diferentes órganos.

Efecto del DMSO en ovocitos porcinos expuestos durante la MIV (44 h), sobre la viabilidad, la maduración nuclear, la FIV y el DE

El DMSO fue empleado como diluyente para el PFOS, ya que sólo puede ser diluido en algunos solventes orgánicos, pero no en agua. Además, el DMSO permite el ingreso del PFOS al ovocito ya que puede atravesar la membrana celular y de esta manera asegura su paso hacia el interior de la célula. Por lo anterior, fue necesario realizar algunos ensayos para descartar posibles efectos del DMSO en la viabilidad, la maduración nuclear, la FIV y el DE de los ovocitos expuestos durante la MIV, esto permitió saber si podía ser utilizado para tales fines.

En este trabajo el resultado de los procesos estudiados antes mencionados, se pueden atribuir únicamente por la exposición al PFOS y no al DMSO ya que al evaluar el efecto del diluyente a las concentraciones proporcionales trabajadas para evaluar al PFOS no arrojaron datos de efecto. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Campagna *et al.*, 2001, quienes indicaron que el DMSO al 0.1 % no tiene repercusiones en la maduración, la fertilización y desarrollo embrionario, aunque en este trabajo se utilizó hasta una concentración de 0.25% sin encontrar algún efecto.

Efecto del PFOS en ovocitos porcinos expuestos durante la MIV (44 h) sobre la viabilidad y la maduración nuclear

La viabilidad de los ovocitos expuestos al PFOS durante la MIV resultó afectada, de una manera concentración-dependiente, es decir, que conforme se incrementó la concentración del PFOS disminuyó el número de ovocitos vivos, así se determinó que la CL₅₀ fue de 31 µM. Esta concentración es similar a la reportada en estudios *in vitro* por Domínguez, 2014 y Teteltitla, 2014. Sin embargo, es importante señalar que esta concentración es muy similar a la encontrada en plasma en trabajadores expuestos (26 µM) (Hansen *et al.*, 2001; Slotkin *et al.*, 2008), lo anterior indica que esta concentración es relevante para sistemas vivos y que estudios *in vitro* pueden ser un

modelo para develar los efectos y posibles mecanismos de acción en organismos expuestos a este perfluorado. In vivo, se ha documentado, que los PFCs pueden actuar como disruptores endocrinos, de tal manera que comprometen la homeostasis hormonal y por lo tanto los procesos en los que intervienen, como la función del eje de regulación hipotálamo-hipófisis-ovario, que al ser alterado repercute sobre la producción, diferenciación, crecimiento, desarrollo y maduración de folículos y ovocitos, así como la subsecuente fertilización y posterior desarrollo embrionario (Austin *et al.*, 2003; Jensen y Leffers, 2008; Zhao *et al.*, 2010). La funcionalidad de las células de la granulosa depende del estímulo hormonal inducido por la LH, que va a desencadenar una vía de señalización estimulada por las frecuencias de Ca^{+2} , aunado a la síntesis de cinasas dependientes de ciclina B o bien las proteínas MAPK (las MAPK tienen actividad tanto en el núcleo como en el citoplasma e intervienen con proteínas del citoesqueleto), que son proteínas indispensables para la activación del MPF y por consiguiente el GVBD, así como su progreso hacia la MI hasta a la MII (Hurk *et al.*, 2005; Sasseville *et al.*, 2009).

Con respecto al efecto observado *in vitro* en la maduración nuclear, la concentración de 9 μ M inhibió la maduración en el 50% de los ovocitos analizados. Al igual que en la viabilidad, la maduración tuvo un efecto concentración dependiente. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Teteltitla, 2014 quién indicó que la maduración se inhibió a una concentración menor que la CL_{50} en ovocitos expuestos al PFOS. Lo anterior indica que el proceso de maduración nuclear es más sensible a concentraciones menores del PFOS que la encontrada para la CL_{50} . Es posible que esta inhibición suceda por causas multifactoriales por ejemplo la interacción del PFOS con proteínas o factores importantes para el reinicio de la meiosis y no por la muerte del ovocito (Santos *et al.*, 2014). Además se sabe que el PFOS a concentraciones de 6.2 y 8 μ M bloquea las uniones comunicantes (Domínguez, 2014; Hu *et al.*, 2002; Upham *et al.*, 1998), y en la MIV la comunicación entre las células del cúmulo, y el ovocito son las responsables del paso de diversos metabolitos que pueden influir en el reinicio o la inhibición de la meiosis. Aunque se sabe que cuando las uniones

comunicantes son interrumpidas se reinicia la meiosis (Abramovich *et al.*, 2004) se ha sugerido que si esta interrupción sucede durante las primeras 4 horas de maduración, puede comprometerse el proceso final de la meiosis (Santiquet *et al.*, 2012; Sasseville *et al.*, 2009). Es posible que en este caso la inhibición de la meiosis se deba a un desequilibrio en la homeostasis del Ca^{+2} ya que se ha reportado que el PFOS provoca alteraciones en el metabolismo de este ión (Harada *et al.*, 2005; Kleszczynski and Skladanowski, 2011), cuyo flujo, a través de los canales tipo-L es esencial en la maduración del ovocito.

Además, el Ca^{+2} también está relacionado con la actividad mitocondrial y la reorganización del citoesqueleto por lo cual sería conveniente analizar cómo se encuentran estos componentes celulares durante la MIV y en presencia del PFOS, ya que la mitocondria es de vital importancia para el aporte energético y el correcto restablecimiento del huso es necesario para la reorganización de los cromosomas. Las señales antes mencionadas son inducidas por segundos mensajeros, iones y hormonas que convergen en vías de señalización complejas, ya que activan también a otras proteínas como proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (Hurk *et al.*, 2005) que tal vez pudieran también verse comprometidas por la presencia de diversos compuestos PFCs. Otra opción es que la actividad de la ciclina B y las oscilaciones de Ca^{+2} pudieran ser un posible mecanismo de acción mediante el cual se pueda explicar el efecto del PFOS en la inhibición de la maduración nuclear. Por todo esto, resulta difícil atribuir un solo mecanismo para explicar como el PFOS retrasa la maduración.

Efecto del PFOS en la FIV, en ovocitos expuestos a concentraciones subletales durante la MIV

La fertilización es un proceso complejo, y el éxito de ésta depende de la calidad del ovocito para completar tanto la maduración nuclear como la citoplasmática, al llevarse a cabo éstas, el cigoto contará con las herramientas necesarias para poder llevar a cabo el bloqueo de la polispermia, la formación de los pronúcleos y la distribución de los organelos en el citoplasma, sin embargo, estos eventos pueden verse comprometidos por la presencia de diferentes sustancias.

Al evaluar el efecto del PFOS en la FIV de ovocitos madurados en su presencia, se observó que éste no afectó los porcentajes de cigotos obtenidos a las concentraciones empleadas, que corresponden a $\frac{1}{4}$ de la CIM_{50} y mayores a esta.

Los resultados de FIV mostraron que ovocitos madurados a partir de $8 \mu M$ tuvieron un 98% de éxito en la fertilización lo que contrasta con resultados obtenidos en MIV, donde ovocitos madurados en concentraciones desde $6.2 \mu M$ sólo presentaban un 32% en MI y el resto el GV. Al respecto, se puede suponer que la presencia del PFOS en el medio de maduración provocó un retraso en la misma, ya que al comparar entre los ovocitos madurados en presencia de PFOS durante 44 h, y los fertilizados, (el PFOS se retiró durante la FIV), los porcentajes de fertilización fueron mayores a los esperados. Esto pudiera ser porque los ovocitos detenidos durante la maduración (44h) en MI, durante la FIV tuvieron un margen para lograr el estadio de MII ya que se ha reportado que el paso de MI a MII puede suceder en un lapso de en 4 h (Sasseville *et al.*, 2009) tiempo suficiente puesto que el proceso de co-incubación con los espermatozoides es de 6 h. Sin embargo hay que aclarar que los ovocitos que reanudaron la meiosis tuvieron que haber llegado al menos a MI, ya que en el modelo porcino está bien documentado que en el período de maduración (44 h), es necesario un período de 18 h en el que ocurre la síntesis de proteínas para que suceda el GVBD.

En este estudio, durante la MIV el PFOS parece haber afectado la maduración nuclear de manera reversible, ya que de acuerdo a los datos de la FIV, se reanudó la maduración para concluir en fertilización. Esto es posible ya que se ha reportado que el efecto del PFOS como inhibidor de uniones comunicantes, a las concentraciones trabajadas, es reversible desde la media hora de haber sido eliminado del medio (Hu, *et al* 2002, Upham *et al.*, 1998).

Es necesario realizar más ensayos para determinar si la presencia del PFOS también pudiera alterar la maduración citoplasmática de manera reversible, ya que en este estudio los datos señalan que no se afectaron ambos parámetros cuando el PFOS estuvo presente 44 h en la MIV.

Los resultados observados en este trabajo contrastan con los reportados en la literatura pues se hace mención de que los ovocitos expuestos a los PFCs en condiciones *in vivo* afectan la calidad del ovocito antes, durante y después de la FIV, así como el DE (ambos *in vitro*). En este trabajo se reporta que la concentración de PFOS a 9 μM sólo afectó la maduración nuclear, mientras que en 8 μM el porcentaje de la FIV y DE no se ven alterados. Esto es similar a lo reportado por Petro *et al.*, 2014, quienes mencionan que los porcentajes de FIV y DE obtenidos *in vitro*, en ovocitos que estuvieron expuestos al PFOS en condiciones *in vivo* fueron altos. Sin embargo, otros hallazgos señalan que la fertilización puede verse comprometida, debido a la disminución en la calidad de los ovocitos, obteniendo bajos porcentajes de fertilización y desarrollo embrionario, no obstante los resultados pueden ser controversiales ya que el modelo de estudio y técnicas empleadas varía entre las investigaciones.

Por otro lado, estudios en roedores expuestos a los PFCs durante el apareamiento, señala que el número de la camada disminuyó y que la maduración sexual de las crías se ve retrasada (Hinderliter, *et al.* 2005). Al respecto varios estudios mencionan que la exposición a los PFCs ocasiona una subfertilidad en mujeres,

reduciendo de esta manera la fertilidad femenina (Governini *et al.*, 2011), por lo que el presente trabajo describe un posible mecanismo a lo anterior.

Efecto de concentraciones subletales del PFOS en el desarrollo embrionario en ovocitos expuesto durante la maduración *in vitro*

El DE desarrollo embrionario de ovocitos expuestos a PFOS durante la MIV, no fue afectado, pues el porcentaje de embriones obtenidos no fue diferente con respecto al control y entre las concentraciones analizadas. Esto es diferente a lo esperado, pues existía la posibilidad de que los ovocitos expuestos al PFOS durante la MIV, sufrieran algún daño que les impidiera una vez alcanzada la etapa de cigoto, lograr dividirse, sin embargo, al no verse comprometida la FIV tampoco lo fue el desarrollo embrionario. Estos resultados contrastan con lo reportado en la literatura que menciona que la exposición a diferentes PFCs ocasiona una disminución en los porcentajes de desarrollo embrionario (Governini *et al.*, 2011), sin embargo, habría que determinar si se debe a una sensibilidad de especie o algún otro factor intrínseco del modelo por ejemplo la edad de las hembras, problemas hormonales etc.

Por otro lado, hallazgos respecto a la exposición durante el apareamiento y la gestación en roedores y humanos, se determinó que al proseguir el desarrollo y culminar el parto existían anormalidades en los fetos y los neonatos así como alteraciones en el tiempo gestacional al grado de provocar la muerte de las crías (Fei *et al.*, 2007; Hinderliter, *et al.* 2005; Reiner, *et al.*, 2009). Es posible que las diferencias encontradas en los resultados con respecto a la literatura quizás se deban al tipo de muestreo, la especie, las técnicas empleadas para el análisis o la variabilidad genética, ya que algunas de ellas no pueden ser controladas. Además en este trabajo la exposición al PFOS solamente sucede durante la maduración del ovocito mientras que en algunos de los otros modelos la exposición es permanente, es decir durante la

maduración, fertilización y DE, sin tomar en cuenta que en condiciones *in vivo* es posible que ambos gametos hayan estado expuestos al perfluorado desde su génesis. Sin embargo, con este estudio es posible determinar que la exposición del PFOS, si sucede en un cierto rango de concentraciones y no es sostenida por largos periodos, sus efectos son reversibles, es posible que los organismos tengan la oportunidad de detoxificar y llevar a cabo los procesos reproductivos de manera adecuada.

Conclusión

La exposición a diversos compuestos xenotóxicos, pueden alterar el proceso de maduración de los gametos. El presente estudio permitió determinar que el PFOS afecta la viabilidad y la maduración de los ovocitos expuestos durante la MIV a una concentración de CL_{50} 31 μ M y CIM_{50} 9 μ M, respectivamente siendo más susceptible de daño la maduración a una concentración menor, con respecto a la viabilidad, en donde existe una respuesta concentración-dependiente para ambos procesos estudiados

En cuanto a los efectos observados en la FIV y el DE, el PFOS no afecta estos procesos a concentraciones subletales (2, 4 y 8 μ M), al respecto, se especula que los daños ocasionados durante la MIV, podrían ser reversibles, ya que no se alteraron los porcentajes de cigotos y embriones. Sin embargo, habría que realizar más estudios al respecto y analizar el porcentaje de ovocitos maduros que se pudieran obtener a las 62 h de maduración, 18 h después de retirar el PFOS. Con estos datos, se podría afirmar sí el PFOS retrasa o inhibe la maduración de los ovocitos, expuestos durante el período de maduración *in vitro*.

Referencias Bibliográficas

Abramovich S.S., Chorev E., Galiani D., Dekel N. (2004). Mitogen-Activated Protein Kinase Luteinizing Hormone-Induced Breakdown of Communication and Oocyte Maturation in Rat Ovarian Follicles. *Endocrinology* 146(3):1236-1244.

Austin, M.E., Kasturi, B.S., Barber, M., Kannan, K., MohanKumar, P.S. and MohanKumar, S.M. (2003). Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environ Health Perspect* 111, 1485-1489.

Betancourt, M., Bonilla, E., Casas, E., Ducolomb, Y. (2003). Maduración de gametos y fertilización en mamíferos. En: *Biología celular y molecular*. Jiménez, F.L. Merchant, H. (eds.) Prentice Hall. México. pp:686-695.

Botella, J, LL. (1995). El ovario. *Fisiología y Patología*. Días de Santos. España. pp: 1-2.

Butenhoff JL, Chang SC, Ehresman DJ, York RG. (2009) Evaluation of potential reproductive and developmental toxicity of potassium perfluorohexanesulfonate in Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol* 27:331-41.

Campagna C, Ayotte P, Sirard MA, Arsenault G, Laforest JP, Bailey JL. (2001). Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocyte following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. *Biol Reprod* 65:554-560.

Changa, SH. Thibodeaux, JR., Eastvold, ML., Ehresman, DJ., Bjork, JA. Froehlich, JW., Lau, C., RJ. Singh., Wallace, KB., Butenhoff, JL. (2008). Thyroid hormone status and pituitary function in adult rats given oral doses of perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Toxicology* 243;330–339.

Clift D y Schuh M. (2013). Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 14 (9): 549-562.

Domínguez A C. (2014). “Efecto del Sulfonato de perfluorooctano (PFOS) en las uniones comunicantes de los COCs porcinos durante la maduración *in vitro* (MIV)”. Tesis de maestría. UAMI. México.

Eppig JJ. (1993). Regulation of mammalian oocyte maturation. In: The ovary (E.Y. Adashi y P.C.K. Leung (e&.) Raven Press, New York:185-208.

Fei C, McLaughlin J, Tarone R, Olsen J. (2007). Perfluorinated Chemicals and Fetal Growth: A Study within the Danish. National Birth Cohort. Environ Health Perspect. 115(11): 1677-1682.

Goldenthal, E. I., Jessup, D. C., Geil, R. G., and Mehring, J. S. (1978). Ninety-day subacute rhesus monkey toxicity study. Study No. 137–092. International Research and Development Corporation, Mattawan, MI. (U.S.EPA Docket No. 8(e) HQ-1180–00374).

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. J Assist Reprod Genet 28:415–418.

Hafez B, Hafez ESE. (2000). Anatomía del aparato reproductor de la hembra. En: Hafez ESE, Hafez B (eds), Reproducción e inseminación artificial en animales. México: Mc Graw-Hill Interamericana.

Halldorsson T I, Rytter D, Haug L S, Bech B H, Danielsen I, Becher, Brink T H, and Olsen S F. (2012). Prenatal Exposure to Perfluorooctanoate and Risk of Overweight at 20 Years of Age: A Prospective Cohort Study. Environ Health Perspect 120:668–673.

Han X, Snow T.A, Kemper R.A. and Jepson G.W. (2003). Binding of Perfluorooctanoic Acid to Rat and Human Plasma Proteins. Chem. Res. Toxicol. 16, 775-781.

Hansen Kristen J., Clemen Lisa A., Ellefson Marke., and Johnson Harold O. (2001). Compound-Specific, Quantitative Characterization of Organic Fluorochemicals in Biological Matrices. Environ. Sci. Technol, 35, 766-770.

Harada, K., Xu, F., Ono, K., Iijima, T. and Koizumi, A., 2005. Effects of PFOS and PFOA on L-type Ca²⁺ currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329: 487-494.

Hinderliter P.M, Mylchreest E, Gannon S.A, Butenhoff J.L, Kennedy Jr. (2005). Perfluorooctanoate: Placental and lactational transport pharmacokinetics in rats. *Toxicology* 211. 139-148.

Hu, W., Jones, P.D., Upham, B.L., Trosko, J.E., Lau, C. y Giesy, J.P., (2002) Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated compounds in rat liver and dolphin kidney epithelial cell lines in vitro and Sprague-Dawley rats in vivo. *Toxicol Sci* 68, 429-436.

Hurk R van den, Zhaob Jia. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63 (2005) 1717–1751.

Inoue, K., Okada, F., Ito, R., Kato, S., Sasaki, S., Nakajima, S., Uno, A., Saijo, Y., Sata, F., Yoshimura, Y., Kishi, R. y Nakazawa, H. (2004). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* 112, 1204-1207.

Jensen A, Leffers H. (2008). Emerging endocrine disruptors: perfluoroalkyl substances. *Int J Androl* 31(2):161–169

Jiménez-Castellanos. B.J. Catalina, H.C. J. Carmona, B.A. (2007). *Anatomía Humana General*. Universidad de Sevilla. Pág: 31-32.

Joensen, U.N., Veyrand, B., Antignac, J.P., Blomberg Jensen, M., Petersen, J.H., Marchand, P., Skakkebaek, N.E., Andersson, A.M., Le Bizec, B., Jorgensen, N., (2013). PFOS (perfluorooctanesulfonate) in serum is negatively associated with testosterone levels, but not with semen quality, in healthy men. *Human reproduction* 28, 599-608.

Johnson J, Gibson S, Ober R. (1979). Extent and Route of Excretion and Tissue Distribution of Total Carbon-14 in Rats after a Single i.v. Dose of FC-95-14C. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency.

König H. E, Liebich H G. (2008). Anatomía de los Animales Domésticos: Texto y atlas en color. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Tomo II. Buenos aires. Panamericana. pp 135-141.

Kleszczynski, K. and Skladanowski, A. C., 2011. Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. III. Disturbance in Ca⁺² homeostasis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 251: 163-168

Lau, C., Butenhoff, J.L. y Rogers, J.M. (2004). The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. Toxicol Appl Pharmacol 198, 231-241.

Longnecker MP, Smith CS, Kissling GE, Hoppin JA, Butenhoff JL, Decker E, Ehresman DJ, Ellefson ME, Flaherty J, Gardner MS, Langlois E, Leblanc A, Lindstrom AB, Reagen WK., Strynar MJ, Studabaker WB. (2008). An interlaboratory study of perfluorinated alkyl compound levels in human plasma. Environ Res 107:152-9.

Luebker D.J, Hansen K.J, Bass N.M, Butenhoff J.L, Seacat A.M. (2002). Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein Toxicology, 176, pp. 175–185

Mehlmann, ML. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. Reproduction 130 791–799.

Nordström U, Bossi R, Leffers H, Astrup A, Skakkebaek N, Jørgensen N. (2009). Do Perfluoroalkyl Compounds Impair Human Semen Quality? Environmental Health Perspectives. 117:6.

Okabe Masaru. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. Development 140 (22): 4471-4479.

Olsen Geary W, Burris Jean M, Ehresman David J, Froehlich John W, Seacat Andrew M, Butenhoff John L, and Zobe Larry R. (2007). Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Worker. *Environmental Health Perspectives* 115:1298–1305.

Petro, E.M.L., D'Hollander W., Covaci A., Bervoets L., Fransen E., De Neubourg D., De Pauw I., Leroy J.L.M.R. Jorssen E.P.A. Bols P.E.J. (2014). Perfluoroalkyl acid contamination of follicular fluid and its consequence for in vitro oocyte developmental competence. *Science of the Total Environment* 496:282-288.

Reiner Jessica L, Nakayama Shoji F, Delinsky Amy D, Stanko Jason P, Fenton Suzanne E, Lindstrom Andrew B, and Strynar Mark J. (2009). Analysis of PFOA in dosed CD1 mice: Part 1. Methods development for the analysis of tissues and fluids from pregnant and lactating mice and their pups. *Reprod Toxicol.* 27(3-4): 360–36

Santiquet, N. W., Develle, Y., Laroche, A., Robert, C. and Richard, F. J., 2012. Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. *Biol. Reprod.* 87: 46.

Santos R.R Schoevers E. J. Roelen B.AJ. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12:117.

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

Seacat A.M, Thomford P.J, Hansen K.J. Olsen G.W., Case M.T., and Butenhoff J.L. (2002). Subchronic Toxicity Studies on Perfluorooctanesulfonate Potassium Salt in Cynomolgus Monkeys. *Toxicological Sciences* 68, 249–264.

Shi, Z., Zhang, H., Liu, Y., Xu, M., Dai, J., (2007). Alterations in gene expression and testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 98, 206-215.

Specht IO, Hougaard KS, Spanò M, Bizzaro D, Manicardi GC, Lindh CH, ToftG, Jönsson BA, Giwercman A, Bonde JP. (2012). Sperm DNA integrity in relation to exposure to environmental perfluoroalkyl substances a study of spouses of pregnant women in three geographical regions. *Reprod Toxicol* 33:577-87.

Slotkin, T.A., MacKillop, E.A., Melnick, R.L., Thayer, K.A. y Seidler, F.J., (2008) Developmental neurotoxicity of perfluorinated chemicals modeled in vitro. *Environ Health Perspect* 116, 716-722.

Teteltitla S M. (2014). "Evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcino expuestos a Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS) *in vitro*". Tesis de maestría. UAMI. México.

Trejo, R., Betancourt, M., Casas, E. (2005). Los gametos: Las células reproductoras de los mamíferos. Editorial Manual moderno. México. pp 52-72.

Tripathi A., Kumar P. K.V. Chaube S.K. (2010). Meiotic Cell Cycle Arrest in Mammalian Oocytes. *J. Cell Physiol.* 223:592-600.

Upham Brad L., Deocampo Nestor D., Wurl Beth and Trosko James E. (1998). Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail. *Int. J. Cancer:* 78, 491–49.

Vélez M, Arbuckle T, Fraser W. (2015). Maternal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fecundity: the MIREC study. *Human Reproduction*, 30(3): 701–709.

Whitworth K, Haug L, Baird D, Becher G, Hoppin J, Skjaerven R, Thomsen C, Eggesbo M, Travlos G, Wilson R, Longnecker M. (2012). Perfluorinated compounds and subfecundity in pregnant women. *Epidemiology.* 23(2): 257–263.

Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD (eds), The Physiology of Reproduction, Segunda ed. New York: Raven Press, Ltd., 189-316.

Yen, S y Jaffe's R. (2009). Reproductive Endocrinology. Ed 6. Editorial ELSEVIER. Pág:160-165.

Young J M and McNeilly A S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. Reproduction 140 489–504.

Yoshida M., Ishizaki Y., Kawagishi H. (1990). Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured in vitro. J Reprod Fert 88: 1-8

Zhao Y, Tan Y, Haslam S, Yang C. (2010); Perfluorooctanoic acid effects on steroid hormone and growth factor levels mediate stimulation of peripubertal mammary gland development in C57B.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00029

Metfodix 202001584

EFFECTO DEL SULFONATO DE PERFLUOROOCTANO (PFOS) EN LA MADURACION *in vitro* DE OVOCITOS PORCINOS Y SU REPERCUSION EN LA FERTILIZACION Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 9 del mes de diciembre del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ
DRA. MARIA MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS
DRA. EDITH ARENAS RIOS
DR. MARIO AGUSTIN ALTAMTRANO LOZANO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ARACELI SALOMON GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ARACELI SALOMON GARCIA
ALUMNA

REVISO

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB
RAMIREZ

VOCAL

DRA. MARIA MARGARITA ZAYIL SALAZAR
CAMPOS

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

SECRETARIO

DR. MARIO AGUSTIN ALTAMTRANO LOZANO