



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00089

Matrícula: 2131800785

EFFECTO DEL MALATIÓN EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS Y SU ASOCIACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDANTE

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 30 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
- DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ
- DRA. MARIA LUISA ESCOBAR SANCHEZ
- DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: DIANA LISBETH FLORES MARTINEZ

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

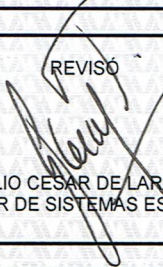
**APROBAR**

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





DIANA LISBETH FLORES MARTINEZ  
ALUMNA

REVISÓ




LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



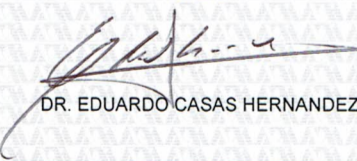
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE



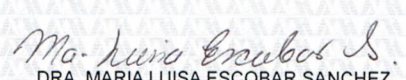
DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL



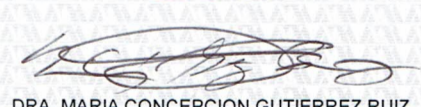
DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

VOCAL



DRA. MARIA LUISA ESCOBAR SANCHEZ

SECRETARIA



DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“EFECTO DEL MALATIÓN EN LA MADURACIÓN IN VITRO  
DE OVOCITOS PORCINOS Y SU ASOCIACIÓN  
CON EL ESTRÉS OXIDANTE”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A:**

**M. EN BIOL. EXP. DIANA LISBETH FLORES MARTÍNEZ**

**CO-DIRECTORAS:**

**DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ**

**DRA. VERÓNICA SOUZA ARROYO**

**ASESOR:**

**DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE**

## **COMITÉ TUTORAL**

### **Co-Director**

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez  
Profesor Titular “C”, T.C.  
Laboratorio de Biología Celular  
Departamento Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Dra. Verónica Souza Arroyo  
Profesor Titular “C”, T.C.  
Laboratorio de Fisiología Celular  
Departamento Ciencias de La Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

### **Asesor**

Dr. José Miguel Betancourt Rule.  
Profesor Titular “C” T.C.  
Laboratorio de Biología Celular  
Departamento Ciencias de La Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular y en colaboración con el laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la co-dirección de las doctoras Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez y Verónica Souza Arroyo y la asesoría del doctor José Miguel Betancourt Rule.

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Para la realización de los estudios de doctorado la alumna Diana Lisbeth Flores Martínez contó con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro de la beca 248824/CVU: 372614.

## AGRADECIMIENTOS Miembros del jurado

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión de posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada


**“Efecto del malatión en la maduración in vitro de ovocitos porcinos y su asociación con el estrés oxidante”**

Que presentó la M en B.E Diana Lisbeth Flores Martínez.

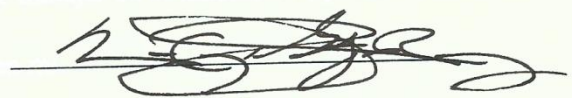
Con fecha de presentación para obtener el grado de Doctorado el día 30 de marzo del 2017.

### **Sinodales:**

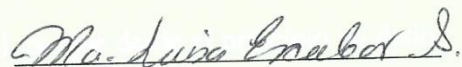
Dr. José Miguel Betancourt Rule (Presidente)



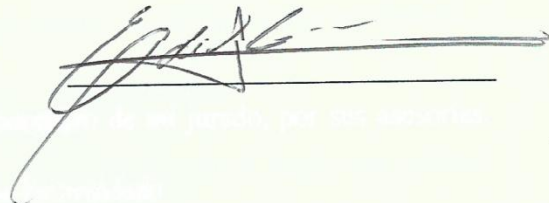
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz (Secretaria)



Dra. María Luisa Escobar Sánchez (Vocal)



Dr. Eduardo Casas Hernández (Vocal)



## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna forma, mediante su apoyo y colaboración, han hecho posible la realización de esta tesis.

Son muchas las personas especiales a las cuales me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en cada momento.

Pero en concreto y especialmente quiero demostrar mi gratitud a las siguientes personas:

Agradezco de manera muy especial a los miembros de mi comité tutorial y sinodales, por su apoyo, aporte de conocimientos y experiencia para la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Yvonne Ducolomb por el gran apoyo y dirección de tesis, por su apoyo incondicional, consejos, paciencia y sobre todo por su amistad brindada en todos estos años.

Al Dr. Miguel Betancourt gracias por la revisión de esta tesis, por compartir sus conocimientos, por sus valiosos y sabios consejos.

A los dos les agradezco haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por creer en mí desde el principio y por su confianza depositada en mí.

A la Dra. Verónica Souza, por ser mi inspiración con sus conocimientos sobre el tema de estrés oxidante, por su paciencia y apoyo incondicional, porque desde el principio no dudó en formar parte de mi comité tutorial como co-directora y por todas sus aportaciones y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Luisa Escobar por haber aceptado ser miembro de mi jurado, por sus asesorías, consejos, apoyo, confianza y por su amistad que me ha brindado.

Mi gran admiración y respeto a la Dra. Concepción Gutiérrez, gracias por la revisión de esta tesis, por compartir sus conocimientos, por sus valiosos y sabios consejos.

A todos los profesores del Laboratorio y del Posgrado en Biología Experimental:

Al Dr. Eduardo Casas, Dr. Humberto González, Dr. Edmundo Bonilla, Dra. Irma Jiménez, Dra. Zayil Salazar y la Dra. Cristina González por estar siempre dispuestos a apoyarme con sus valiosos conocimientos y animarme con sus palabras.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología Celular; que hacen siempre el ambiente más agradable, en especial agradezco al M. Mario Teteltila, por haberme brindado siempre su apoyo y ayuda en la realización del trabajo experimental de este proyecto, además de su compañía en las idas al rastro y por su amistad.

A Dra. Graciela Gavia y a la M. Itzel Plancarte por brindarme siempre su amistad, por su apoyo y sus valiosos consejos.

Al M. Alejandro Campuzano por brindarme siempre su apoyo cuando tenía una duda y por su paciencia, apoyo y amistad.

A mis compañeros Andy, Angy, Alma, Ara y Lalo por su apoyo, consejos y compañerismo.

A todos gracias por los agradables momentos que me hicieron pasar en el laboratorio.

A la Dra. Elizabeth Zarate y a la M. Patricia Rosales y por su apoyo, paciencia y por estar dispuestas siempre a compartirme sus valiosos conocimientos en las diferentes técnicas empleadas en mi proyecto y por su amistad.

A mis padres Evelia y Carlos, por ser siempre los pilares más importantes en mi desarrollo y demostrarme su invaluable apoyo incondicional, interés en mi superación profesional y depositar siempre en mi su confianza y comprensión a cada momento.

A mis hermanos Ari, Angy y Roberto, por apoyarme e impulsarme a lograr mis sueños, sobre todo por formar parte de ellos y exhortarme a seguir en este camino.

**“No hablar sobre ciencia me parece perverso... cuando uno se enamora se lo quiere gritar al mundo” -Carl Sagan**

**“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es un océano” -Isaac Newton**

**“No es la especie más fuerte la que sobrevive, ni la más inteligente, sino la que responde mejor al cambio” -Charles Darwin**



## ABREVIATURAS

<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CC</b>	Células del cúmulo
<b>CIM<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibición de la maduración 50
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración letal 50
<b>COCs</b>	Complejo ovocito células del cúmulo
<b>EOx</b>	Estrés oxidante
<b>EROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>G6PD</b>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GSH-Px</b>	Glutación peroxidasa
<b>GST</b>	Glutación S Transferasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LPO</b>	Lipoperoxidación
<b>MI</b>	Metafase I
<b>MII</b>	Metafase II
<b>MIV</b>	Maduración in vitro
<b>MTT</b>	Metil- tiazolil-difenil-tetrazolio
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OF</b>	Organofosforados

<b>REL</b>	Retículo endoplásmatico liso
<b>RVG</b>	Rompimiento de la vesícula germinal
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TBARS</b>	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>VG</b>	Vesícula germinal

## RESUMEN

El malatión es uno de los insecticidas más usados. Estudios recientes han mostrado que induce estrés oxidante (EOx) en células somáticas, pero no hay suficientes estudios que demuestren este efecto en células germinales. El malatión afecta tanto la viabilidad como la maduración de los ovocitos porcinos, pero no existen estudios que hayan demostrado que el EOx afecta su maduración, ni tampoco cuáles son los mecanismos bioquímicos que se ven afectados durante este proceso en los complejos ovocito células del cúmulo (COCs). El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del EOx producido por el malatión en los COCs porcinos madurados in vitro. Distintas concentraciones de malatión: 0, 750  $\mu\text{M}$  ( $\text{CIM}_{50}$ ) y una subletal de 1000  $\mu\text{M}$ , se usaron para evaluar el contenido de las enzimas antioxidantes, la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), la oxidación de proteínas y la lipoperoxidación (LPO). La viabilidad de los COCs y la maduración de los ovocitos disminuyeron de manera concentración-dependiente. El malatión incrementó el contenido de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión-S-transferasa (GST) y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), y disminuyó el contenido de las enzimas glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (CAT). Los niveles de EROS, de oxidación de proteínas y de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) aumentaron en los COCs expuestos al insecticida, pero cuando los COCs fueron pre-tratados con el antioxidante trolox (50  $\mu\text{M}$ ), no se presentó daño oxidante. Este estudio demostró que el malatión tiene un efecto dañino sobre los COCs durante la maduración in vitro (MIV), produciendo EOx, mientras que el trolox previno la toxicidad del malatión abatiendo el daño oxidante.

**Palabras clave:** Porcino, ovocitos, maduración in vitro, estrés oxidante, malatión, trolox.

## ABSTRACT

Malathion is one of the most commonly used insecticides, recent findings have demonstrated that it induces oxidative stress in somatic cells, but there are not enough studies demonstrating this effect in germ cells. Malathion impairs porcine oocyte viability and maturation, but studies have not shown how oxidative stress affects maturation and which biochemical mechanisms are affected in this process in cumulus cell oocyte complexes (COCs). The aim of the present study was to determine the effect of oxidative stress produced by malathion in porcine COCs matured in vitro. Different concentrations of malathion: 0, 750  $\mu\text{M}$  ( $\text{IMC}_{50}$ ) and sub-lethal of 1000  $\mu\text{M}$ , they were used to evaluate the content of antioxidant enzymes, reactive oxygen species (ROS), protein oxidation, and lipid peroxidation (LPO). COCs viability and oocyte maturation decreased in a concentration-dependent manner. Malathion increased superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) and glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) content, and decreased glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) content. ROS, protein oxidation and TBARS levels increased in COCs exposed to the insecticide, but when COCs were pre-treated with the antioxidant trolox (50  $\mu\text{M}$ ) before malathion exposure, these parameters decreased. This study showed that malathion has a detrimental effect on COCs during in vitro maturation (IVM), inducing oxidative stress, while trolox prevented malathion toxicity by decreasing oxidative damage.

**Keywords:** Porcine, oocyte, in vitro maturation, oxidative stress, malathion, trolox.

# ÍNDICE:

ÍNDICE: .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS .....	4
1.2. MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS .....	7
1.2.1. Maduración nuclear o meiótica .....	8
1.2.2. Maduración citoplasmática .....	9
1.2.3. Ovulación .....	10
1.2.4. Papel de las células del cúmulo en la maduración de los ovocitos .....	11
1.3. TOXICOLOGÍA REPRODUCTIVA .....	12
1.3.1. Métodos de evaluación de toxicidad .....	13
1.4. Importancia del modelo porcino .....	14
1.5. PLAGUICIDAS .....	15
1.5.1. Compuestos organofosforados .....	16
1.6. MALATIÓN .....	17
1.6.1. Fuentes de exposición .....	20
1.7. TOXICOCINÉTICA .....	20
1.7.1. Absorción y distribución del malatión .....	20
1.7.2. Modo de acción .....	21
1.7.3. Metabolismo y distribución .....	24
1.7.4. Excreción .....	24
1.8. ESTRÉS OXIDANTE .....	25
1.8.1. Aspectos generales .....	25
1.8.2. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno .....	25
1.8.3. Efectos dañinos de las EROS .....	26
1.8.4. Peroxidación lipídica .....	27

2.	ANTIOXIDANTES.....	28
2.1.	Antioxidantes enzimáticos.....	28
2.2.	Antioxidantes no enzimáticos .....	29
2.3.	EFFECTOS DEL ESTRÉS OXIDANTE EN LA REPRODUCCIÓN DE LA HEMBRA	30
3.	ANTECEDENTES.....	31
3.1.	EFFECTOS SOBRE LA SALUD .....	31
3.1.1.	Efectos hematológicos .....	31
3.1.2.	Estudios de genotoxicidad.....	32
3.1.3.	Efectos en la reproducción .....	32
3.2.	EFFECTOS DEL MALATIÓN SOBRE EL EOX.....	34
4.	JUSTIFICACIÓN .....	35
5.	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	37
6.	OBJETIVOS .....	38
6.1.	Objetivo general.....	38
6.1.1.	Objetivos particulares .....	38
7.	HIPÓTESIS.....	38
8.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
8.1.	Maduración in vitro.....	39
8.2.	Colección de los Complejos Ovocitos-Células del Cúmulo.....	39
8.3.	Tratamiento con malatión.....	41
8.4.	Tratamiento con trolox.....	41
8.5.	Evaluación de la viabilidad de los COCs y la MIV de los ovocitos .....	41
8.6.	EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDANTE .....	43
8.6.1.	Cuantificación de especies reactivas de oxígeno.....	44
8.6.2.	Análisis del contenido de proteína por Western blot .....	44
8.6.3.	Determinación del contenido de proteínas .....	45
8.6.4.	Determinación de la oxidación de proteínas.....	46

8.6.5.	Medición de los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico .....	47
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
10.	RESULTADOS.....	49
10.1.	Efecto del malatión en la viabilidad de los COCs y la MIV de los ovocitos.....	49
10.2.	Efecto del malatión sobre la producción de EROS en los COCs porcinos.....	50
10.3.	Efecto de malatión en la expresión de las enzimas antioxidantes.....	52
10.4.	Efecto del malatión en la oxidación de proteínas.....	55
10.5.	Efecto de malatión en los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	56
10.6.	Efecto de malatión en las fases meióticas de los ovocitos.....	57
11.	DISCUSIÓN .....	59
12.	CONCLUSIONES .....	72
13.	REFERENCIAS .....	73

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

En las hembras de los mamíferos, los órganos reproductores son los ovarios, productores de los ovocitos y de las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progestágenos).

La ovogénesis es la formación y la maduración del gameto de las hembras que se inicia en la etapa embrionaria, comienza con la migración de las células germinales primordiales hacia la cresta gonadal donde se diferencian en ovogonias (Bielanska-Osuchowska, 2006).

Las ovogonias son las células precursoras de los ovocitos y surgen de las células germinales a partir del saco vitelino formado del intestino posterior del embrión. Las ovogonias son diploides ( $2n$ ) y se encuentran en el ovario, dentro del folículo primario donde se dividen mitóticamente. En la mayoría de los animales domésticos, las ovogonias y ovocitos se desarrollan durante la primera mitad de la gestación, mientras que en la cerda, perra y gata la ovogénesis se extiende hasta las primeras semanas después del nacimiento.

En casi todas las especies de mamíferos no hay división mitótica de la célula germinal femenina después del nacimiento, de manera que el número de ovocitos presentes al nacimiento representa el total disponible durante la vida del animal (Baker, 1982).

Después de la proliferación mitótica, las ovogonias se diferencian en ovocitos primarios. En este estado se inicia la primera división meiótica, que en la pubertad formará al ovocito secundario y al primer cuerpo polar. En esta primera división se separan los cromosomas homólogos, se reduce el número cromosómico y la célula se vuelve haploide ( $n$ ), en la etapa de Diploteno de la Profase I. La segunda división meiótica, es el punto donde ocurre la separación de las cromátidas hermanas, produciéndose la formación del segundo cuerpo



polar; sin embargo, esta última división sólo se completará hasta el momento en que ocurra la fertilización (Betancourt et al, 2003).

El folículo es la unidad morfológica y funcional del ovario. Está formado por una capa exterior de células tecaes que envuelve, por fuera de la membrana basal, capas internas de células de la granulosa. A su vez, las células del cúmulo (CC) confinan al complejo formado por el ovocito, llamado complejo ovocito células del cúmulo (COCs) (Rajkovic et al, 2006).

El crecimiento del folículo se inicia al mismo tiempo que el del ovocito, posteriormente, el crecimiento del ovocito se lleva a cabo más lentamente y el del folículo prosigue. Después de que se forman los ovocitos primarios, éstos se rodean de una capa sencilla de células epiteliales aplanadas y se establece el folículo primordial o primario que se encuentra en el parénquima ovárico. La mayoría de los folículos que inician su desarrollo se vuelven atrésicos, es decir degeneran. En la mayor parte de las especies de mamíferos, los primeros folículos en crecimiento aparecen en el ovario durante los primeros días después del nacimiento, aunque en los primates pueden presentarse antes del nacimiento. (Baker, 1982; Bearden y Fuquay, 1982; Betancourt et al, 2003).

El ovocito alojado dentro del folículo primario aumenta su tamaño y las células foliculares que lo circundan emiten prolongaciones citoplásmicas hacia el ovocito estableciendo entre ellas uniones comunicantes. El contacto entre el ovocito y las células foliculares es importante para el desarrollo y la viabilidad del ovocito, ya que a través de las uniones comunicantes recibe nutrientes como piruvato y precursores metabólicos dentro de los que se encuentran aminoácidos y nucleótidos y participan en el arresto meiótico. En esta etapa se forma la zona pelúcida, que es una matriz extracelular compuesta por glicoproteínas (Betancourt et al, 2003; Dunbar et al, 1980).

Durante el crecimiento folicular, a medida que se multiplican las células foliculares se forma un espacio entre ellas, el antro, que se llena de un líquido con una composición similar a la del suero sanguíneo que es modificado por el ambiente folicular y que constituye el fluido folicular. A medida que aumenta la entrada de este fluido, aumenta la cavidad y se forma el antro folicular. En esta etapa el folículo, ya maduro, es clasificado como folículo terciario o de Graaf. El folículo terciario está formado por varias capas celulares: una capa exterior constituye la teca externa, por debajo de ésta se encuentra la teca interna, una lámina basal y hacia el interior del folículo está situada la granulosa que rodea al antro (Baker, 1982; Bearden y Fuquay, 1982; Hafez y Hafez, 2000).

Al aumentar el tamaño del antro, el ovocito adquiere una posición lateral en el folículo y queda rodeado por varias capas de células de la granulosa, las células que tienen contacto con el ovocito constituyen la corona radiada que junto con las CC forman el complejo ovocito-células del cúmulo (COCs) (Baker, 1982).

El crecimiento preantral del folículo es independiente de las hormonas gonadotropinas folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), ya que la extirpación de la hipófisis, donde se producen, no altera su crecimiento inicial. Sin embargo, el control de la fase final del crecimiento folicular es determinado por la influencia de FSH y LH, cuya función en ese momento es la de inducir la síntesis de esteroides por parte de las células de la teca interna.

Las células de la granulosa presentan receptores de FSH y la unión de esta hormona con sus receptores promueve la síntesis de aromatasa que a su vez convierte los andrógenos producidos en las células de la teca, en estrógenos (Young y McNeilly, 2010).

En cada ciclo reproductor, bajo la influencia de la FSH liberada por la hipófisis, los folículos en crecimiento son estimulados para que continúen su crecimiento y alcancen su maduración (Baker, 1982; Hafez y Hafez, 2000).

## ***1.2. MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS***

La maduración del ovocito, es la última de una serie de etapas que debe pasar el gameto femenino para adquirir la capacidad de ser fecundado y dar origen a un nuevo individuo. Son una serie de cambios bioquímicos y morfológicos del ovocito que ocurren dentro del folículo, que lo prepara para llevar a cabo la fertilización y el desarrollo embrionario.

Durante la vida fetal en la mayoría de los mamíferos el ovocito queda detenido en el estado de diploteno de la profase I, el núcleo del ovocito se conoce como vesícula germinal (VG) (Richard, 2007). En este estado el ovocito no puede ser fecundado, ya que es necesario que crezca junto con el folículo y que se produzcan cambios morfológicos, ultraestructurales y moleculares que le permitirán reanudar la meiosis hasta que se alcance la pubertad por acción de las hormonas gonadotrofinas. Los cambios más aparentes e importantes son la formación de un núcleo haploide y un aumento de tamaño debido al material acumulado en su citoplasma (Conti et al, 2012).

Como resultado de la interacción entre los diferentes niveles de regulación, paracrina y endocrina, solamente unos pocos ovocitos son seleccionados para iniciar la etapa de maduración a lo largo de la vida fértil, mientras que la mayor parte degeneran en atresia. A este conjunto de cambios se le conoce como maduración ovocitaria, la cual incluye dos procesos: maduración nuclear o meiótica y maduración citoplasmática, ambos procesos son necesarios para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Sato et al, 1990; Conti et al, 2012).

### **1.2.1. Maduración nuclear o meiótica**

Este proceso inicia con la reanudación de la primera división meiótica hasta el arresto en metafase de la segunda división meiótica (Wani, 2002). El reinicio de la meiosis se presenta después del pico preovulatorio de la hormona LH, por la activación de proteínas con actividad de cinasa, las cuales inducen a que el núcleo reinicie la meiosis, dando pauta a los siguientes eventos: polimerización de microtúbulos, condensación y alineación de los cromosomas en la placa metafásica (metafase I); posteriormente los pares de cromosomas homólogos se separan asimétricamente originando el ovocito secundario y el primer cuerpo polar. Al iniciar la meiosis II el ovocito detiene su desarrollo presentándose el segundo arresto meiótico (Trounson et al, 2001).

Antes de la maduración, el núcleo del ovocito se encuentra en estado de vesícula germinal (VG); en la etapa de rompimiento de la vesícula germinal (RVG) el nucléolo y membrana nuclear desaparecen y los cromosomas se condensan. En la metafase I (MI) los pares de cromosomas son visibles y al final de la primera división meiótica, se libera el primer cuerpo polar y el ovocito queda detenido en la metafase II (MII) (Kharche et al, 2006). En la mayoría de los mamíferos la ovulación se lleva a cabo durante la metafase de la segunda división meiótica, sólo cuando el ovocito es fertilizado concluye la segunda división meiótica y se expulsa el segundo cuerpo polar. En condiciones *in vitro*, el reinicio de la meiosis se presenta espontáneamente al remover el ovocito del ambiente folicular así como por la ruptura de las uniones intercelulares (Tosca et al, 2007).

### **1.2.2. Maduración citoplasmática**

La maduración citoplasmática engloba los siguientes procesos: acumulación de proteínas y RNAm; desarrollo de mecanismos reguladores de calcio; cambios en la actividad del factor promotor de la maduración (MPF) y la cinasa de proteínas activadas por mitógenos (MAPK); y reorganización de organelos celulares. Estos procesos permiten que el ovocito finalice la maduración nuclear y posteriormente se realice la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Fan y Sun, 2004; Ferreira et al, 2009).

#### ***Redistribución de los organelos citoplasmáticos***

Durante la maduración, la posición de las mitocondrias cambia desde una localización periférica a una distribución dispersa en todo el citoplasma. La cantidad de ribosomas aumenta a partir del inicio de la maduración, observándose también un aumento de la síntesis de proteínas. En el estado de VG, el retículo endoplásmico liso (REL) se encuentra uniformemente distribuido en el citoplasma, pero al final de la maduración se localiza en la zona cortical, e incrementa la liberación de  $Ca^{2+}$  que ocurre durante la fecundación y que induce el comienzo del desarrollo embrionario (Ferreira et al, 2009).

Los gránulos corticales son organelos derivados del Aparato de Golgi y están presentes solamente en los ovocitos. En los ovocitos inmaduros están distribuidos en el citoplasma pero durante la maduración se relocalizan en la zona cortical, muy próximos a la membrana. En respuesta a la entrada de un espermatozoide al citoplasma, el REL libera  $Ca^{2+}$  que lleva a la exocitosis de los gránulos corticales, lo que induce cambios en la zona pelúcida que previenen la polispermia. La entrada de más de un espermatozoide en el ovocito lleva a alteraciones cromosómicas incompatibles con el desarrollo embrionario temprano (Fan y Sun, 2004; Ferreira et al, 2009).

La maduración nuclear puede observarse con la ayuda de un microscopio. Sin embargo, la maduración citoplasmática no se puede apreciar por este medio, para evaluar ésta se utilizan criterios como: migración de los gránulos corticales hacia la periferia, incremento en el número de mitocondrias y gotas de lípidos y la capacidad del ovocito para desarrollarse hasta el estado de blastocisto. Estos procesos pueden evaluarse por técnicas de inmunofluorescencia o métodos bioquímicos (Wani, 2002).

Los procesos antes mencionados regulan la maduración nuclear y citoplasmática; las gotas de lípidos y las mitocondrias proveen de la energía necesaria para maduración, fertilización y desarrollo embrionario temprano (Ambruosi et al, 2009).

### **1.2.3. Ovulación**

El comienzo de la maduración preovulatoria es producida por la elevación repentina de gonadotropinas, especialmente de LH. En respuesta al aumento de la hormona aumenta la cantidad del fluido folicular en el antro, como consecuencia el tamaño del folículo aumenta. Durante esta etapa las células que están en contacto con el ovocito adquieren una forma columnar. El área celular que se encuentra rodeando al ovocito forma un pequeño tallo y el ovocito sólo queda rodeado por la corona radiada y las CC. Al finalizar este periodo el COC puede quedar libre en el fluido folicular (Baker, 1982).

Al terminar el crecimiento folicular, la acción de la LH hace que se presente la ovulación por mecanismos que aún no están bien dilucidados. Hay una expansión del folículo debido a la actividad de enzimas proteolíticas, aumentan la permeabilidad vascular y la presión del fluido folicular y se presenta la isquemia de los capilares del folículo (Baker, 1982; Hafez y Hafez, 2000; Shimada et al, 2001).

Con el pico preovulatorio de la LH, el núcleo del ovocito que hasta ese momento se encontraba en estado de VG, en la etapa de diploteno de la profase de la primera división meiótica, reinicia la meiosis (Baker, 1982; Hafez y Hafez, 2000; Shimada et al, 2001).

La liberación de las gonadotropinas suprime un factor inhibitorio conocido como Inhibidor de la Maduración del Ovocito (OMI) que se encuentra en el fluido folicular y que es secretado por las células de la granulosa. La reanudación de la meiosis se caracteriza por el RVG (Planchot y Mandelbaum, 1990). Durante esta etapa se condensan los cromosomas. Al final de la primera división meiótica, sin que haya una interfase de por medio, el ovocito prosigue hasta la MII, etapa en la cual en la mayoría de los mamíferos ocurre la ovulación (Austin, 1982).

#### **1.2.4. Papel de las células del cúmulo en la maduración de los ovocitos**

Las células del cúmulo (*cumulus oophorus*) se definen como un grupo de células de las granulosas estrechamente asociadas, que rodean al ovocito en el folículo ovárico antral. En respuesta a la oleada preovulatoria de gonadotropinas, el ovocito reanuda la meiosis y las CC comienzan a producir ácido hialurónico, que se deposita en los espacios intercelulares; este fenómeno se denomina expansión del cúmulo.

La comunicación intercelular entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean es de vital importancia, en primer lugar para mantener al ovocito detenido en profase I de la meiosis y más tarde para reanudar la meiosis en el momento de la ovulación. La comunicación el ovocito y las CC es necesaria para la supervivencia del ovocito y su desarrollo. A través de las uniones comunicantes se transfieren sustancias nutritivas de bajo peso molecular como el piruvato y precursores metabólicos como aminoácidos y

nucleótidos. Estas sustancias permiten concluir con la primera división meiótica y adquirir su capacidad fecundante. Después de que se produce un incremento en los niveles de LH, que induce la ovulación, las señales intercelulares se interrumpen por la producción de ácido hialurónico por parte de las CC que ocasiona su dispersión. El ovocito secreta un factor inductor de la expansión de las CC (Epigg, 1991).

Las CC se comunican entre sí y con el ovocito por medio de uniones comunicantes por lo tanto, estas células desempeñan un papel importante en la maduración del ovocitos: 1) al mantener el ovocito en detenimiento meiótico, 2) al participar en la reanudación de inducción meiótica, y 3) al participar en la maduración citoplasmática (Tanghe et al, 2002).

### ***1.3. TOXICOLOGÍA REPRODUCTIVA***

El daño a la función reproductiva y al desarrollo embrionario se ha asociado a la acción de ciertos agentes exógenos. La toxicología reproductiva se define como la rama de la toxicología que estudia los efectos deletéreos en la reproducción producidos por agentes ajenos al organismo llamados xenobióticos; como los plaguicidas. Esta rama de la toxicología se encarga de estudiar las causas, mecanismos, manifestaciones y secuelas de los efectos adversos sobre la reproducción; comprendiendo estudios de trastornos de la fertilidad masculina y femenina, efectos en la libido, mutagénesis, teratogénesis, y muerte fetal (Martínez y Chamorro, 2004). Esta rama se ha enfocado principalmente a fármacos, agentes químicos y contaminantes del ambiente laboral y del medio ambiente, que pueden alterar la fertilidad o el desarrollo de los organismos.

Durante los últimos 50 años se ha producido un aumento en las patologías tanto del tracto reproductor femenino como masculino y una disminución en la calidad de los gametos. La mayoría de estos daños son ocasionados por mecanismos asociados al estrés oxidante



(EOx). El sistema reproductor femenino se ve afectado por una gran cantidad de xenobióticos, los cuales tienen una elevada toxicidad aguda y/o crónica, produciendo efectos adversos en la ovogénesis, induciendo daño en los ovarios y disminución de la calidad de los ovocitos (Aitken y Baker, 2006), entre otros efectos.

### **1.3.1. Métodos de evaluación de toxicidad**

De manera general, la mayoría de los estudios toxicológicos son descriptivos y se limitan a las observaciones de los efectos que tiene un compuesto sobre algunas características de los organismos, como peso corporal o histopatología de los órganos, y en el caso de aquellos compuestos que afectan la función reproductiva, algunos estudios se han enfocado a los efectos de la exposición in útero sobre el desarrollo embrionario y fetal (Hood, 2012).

La mayor parte de la información sobre agentes que afectan la función reproductiva son derivados de estudios con animales, ya que es muy complicado realizar estudios epidemiológicos en humanos, debidos principalmente a implicaciones éticas y a la dificultad de obtener muestra adecuadas (Manson y Kang, 1994; Sharpe, 2000).

El interés por la evaluación de los efectos de agentes tóxicos en la integridad y competencia reproductivas de los humanos se ha incrementado, empleando para ello bioensayos analíticos que intentan descifrar el mecanismo de acción de los tóxicos y establecer, en lo posible, una relación entre el grado de exposición a un químico con el síndrome de toxicidad observado (Brusick, 1987; Mattison et al, 1990). Con esto se pretende lograr que los métodos de evaluación para las sustancias reprotóxicas disminuyan sus costos y cuenten con protocolos de menor duración que los actuales, ya que es práctica común que algunos de estos estudios sean multigeneracionales. Sin embargo, dada la cantidad de agentes

tóxicos a los que estamos expuestos, y de los cuales sólo a un porcentaje muy bajo se le ha evaluado el riesgo reproductivo, se hace necesaria la utilización de sistemas in vitro que permitan una valoración rápida, económica y precisa del daño causado por dichos agentes. Los estudios in vivo en animales experimentales, trabajadores ocupacionalmente expuestos y comunidades expuestas proveen información acerca de los efectos tóxicos de los agentes xenobióticos. No obstante, el uso de modelos in vitro puede proveer información valiosa para entender los mecanismos básicos de la toxicidad, lo cual es complicado de identificar en el organismo íntegro. Por esto es importante realizar estudios de toxicología reproductiva para dilucidar los mecanismos por los cuales los xenobióticos afectan a la gametogénesis, la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Kimmel et al, 1995; Hood, 2012).

#### ***1.4. Importancia del modelo porcino***

El cerdo es un modelo adecuado para realizar estudios sobre la reproducción como son el reconocimiento y la interacción de los gametos en el momento de la fertilización y el desarrollo embrionario (Santos et al, 2014).

Hasta ahora los ratones han sido el principal modelo, aunque no el más adecuado para estudiar enfermedades como la arteriosclerosis, anemia falciforme, enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes, linfáticas, dermatitis y cáncer de próstata. Muchos de estos modelos deberían que ser llevados a cabo en animales domésticos para poder ser útiles para el humano.

En toxicología reproductiva, el modelo porcino en sustitución de los roedores, como animal “modelo”, es indicado para evaluar la maduración de ovocitos, debido a que el cerdo

presenta muchas similitudes anatómicas, fisiológicas y bioquímicas con la especie humana además de que, la etapa de desarrollo de la activación del genoma embrionario es similar en ambas especies (Santos et al, 2014).

### ***1.5. PLAGUICIDAS***

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de diferentes sustancias que se destina a controlar plagas, incluidos los vectores que transmiten enfermedades en humanos y otros animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de otros animales (CICOPLAFEST 2002; Albert, 2004).

Dentro de los plaguicidas están los insecticidas, herbicidas y fungicidas, a nivel mundial su producción es de aproximadamente 2.5 ton/año, siendo los países en vías de desarrollo los que más hacen uso de estos compuestos (EPA, 2006).

Sin embargo, el uso generalizado de estos compuestos y su liberación al ambiente han provocado el incremento en la contaminación ambiental.

La contaminación por insecticidas ha llegado hasta regiones alejadas de las zonas donde se emplean. En la región ártica se han detectado insecticidas organoclorados en la fauna marina y en la sangre, leche materna, secreciones del tracto genital, semen y fluido folicular de los humanos que consumen estos animales (Campagna et al, 2001).

Dentro de los plaguicidas más utilizados destacan los insecticidas organofosforados (OF), (Marroni et al, 2000).

### **1.5.1. Compuestos organofosforados**

Los plaguicidas organofosforados (OF) son ésteres o tioles derivados del ácido fosfórico o fosforotioico, contienen fósforo y carbono y según su estructura química se les puede añadir un grupo radical arilo o alquilo y formar fosfinatos, se les puede unir también un oxígeno o un sulfuro formando fosfatos y fosfotioatos, respectivamente (OMS, 1986).

Los OF fueron introducidos en la década de 1930, su principal efecto como insecticida se descubrió durante las operaciones militares cuando se utilizaban inicialmente como gases que afectaban al sistema nervioso (Dyro, 2003).

Estos compuestos se han utilizado más comúnmente como insecticidas. Son ampliamente usados para incrementar la producción y minimizar las pérdidas en la agricultura. Son químicos ampliamente usados para el control de plagas de insectos, roedores, moluscos, hongos, etc. Sin embargo, tienen efectos adversos en especies que no son el blanco como aves y mamíferos y en humanos han sido responsables de un gran número de intoxicaciones. Exposiciones prolongadas a los compuestos OF se han relacionado con enfermedades crónicas como algunas neurodegenerativas (EPA, 2006).

Por lo general estos compuestos son solubles en lípidos y son capaces de penetrar en la piel, la barrera hematoencefálica, la placenta y en el feto (EPA, 2006).

Este grupo de productos químicos incluye insecticidas como el malatión, el diazinón, el clorpirifos, el metil paratión, y el paratión, entre otros (Bhardwaj y Saraf, 2014).

## ***1.6. MALATIÓN***

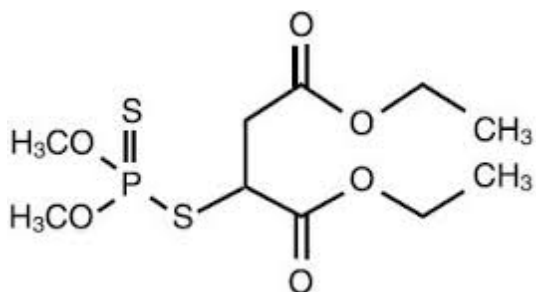
El malatión es uno de los insecticidas OF comúnmente más usados, cuyo nombre químico es dietil (dimetoxitiofosforito) o O-O-dimetil fosforoditioato. También conocido con otros nombres comerciales como: Belatión, Lucathion, Ovide, Carbophos, Maldison y Cythion. Al ser un insecticida de amplio espectro es uno de los OF de uso más frecuente. Es muy soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Es empleado para el control de plagas que afectan a los cultivos agrícolas, plantas ornamentales, invernaderos, ganado y bosques (Blasiak et al, 1999).

El malatión se desarrolló durante la Segunda Guerra Mundial, y se conoce por su alto potencial tóxico para los insectos y, baja toxicidad para los mamíferos. Como insecticida OF, el malatión se registró por primera vez para su uso en los Estados Unidos de América en 1956 por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA). En la actualidad está regulado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2006).

Es un insecticida de amplio espectro utilizado para controlar una variedad de insectos al aire libre, tanto en entornos tanto agrícolas como residenciales. Una estimación por la EPA indica que más de 35 toneladas de malatión se utilizan cada año (USEPA, 2009). En México existen reportes de uso de alrededor de 15,000 toneladas de este insecticida (INEGI, 2007).

Cerca del 60 por ciento del malatión se utiliza a menudo en los programas federales y estatales para erradicar insectos tales como gorgojos del algodón, saltamontes y moscas de la fruta. También se utiliza como un potente insecticida para el control de mosquitos en zonas residenciales, así como para el control de insectos en una variedad de cultivos de alimentos. El malatión también ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) para la adición de champús con el fin de controlar

los piojos (EPA, 2006). La estructura química del malatión se muestra en la Figura 1, y sus propiedades fisicoquímicas se presentan en Tabla 1.



**Figura 1.** Estructura del malatión

**Tabla 1.** Propiedades físicas y químicas del malatión (Tchounwou et al, 2015).

Propiedades	Malatión
Nombre químico (IUPAC)	O-O-Dimetilditiofosfato de dietil mercapto succinato
Nombre comercial	Belatión, Lucathion, Ovide
Fórmula	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>
Grupo	Organofosforados
Peso molecular	330.36
Punto de fusión	3°C
Punto de ebullición	156 °C
(Dosis letal 50) DL <sub>50</sub> oral (mg/kg)	5500 (rata)
Exposición aguda	Efectos colinérgicos, irritante ocular, dérmico, del tracto respiratorio y de mucosas.
Exposición crónica	Inhibición de colinesterasas plasmática y cerebral. Daño hepático.
Usos	Agrícola, pecuario, jardinería, urbano e industrial.

El malatión está regulado a una cantidad máxima de 8 partes por millón (ppm) como residuo en cultivos específicos utilizados para la alimentación. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de malatión se estima en 2100 mg/kg en el hombre (Uygun et al, 2005).

La exposición al malatión se produce a través del contacto dérmico, ingestión y/o inhalación (Tomlin, 2006).

La mayoría de la gente no está expuesta al malatión en el aire que respira o en objetos que tocan, a menos que vivan cerca de las áreas que están siendo fumigadas. Las personas que están en mayor riesgo de toxicidad por malatión son las que están ocupacionalmente expuestas. Estos incluyen los trabajadores agrícolas, rociadores y la gente que trabaja en fábricas que producen malatión u otro tipo de productos que lo contienen. Estos grupos de alto riesgo pueden ser expuestos a través de la absorción de la piel en contacto con productos o superficies contaminadas, o a través de la absorción pulmonar por la inhalación de aire contaminado. Los usuarios del uso doméstico de malatión también están en alto riesgo de intoxicación relacionada con su aplicación en zonas residenciales cerca de casas y jardines para el control de la mosca de la fruta y los mosquitos. La exposición a altas concentraciones de malatión se ha asociado con toxicidad grave y muerte en algunos casos. Por lo tanto, se ha recomendado no entrar o ir a los campos antes de 6 días después de su uso. Además, se recomienda la utilización de equipos de protección personal, como equipos para respiración y ropas especiales que pueden prevenir la toxicidad y proteger contra la intoxicación del malatión.

Los síntomas de la exposición al malatión incluyen dolor de cabeza, náuseas y vómitos, ardor en los ojos, dificultad respirar y letargo (ATSDR, 2008).

### **1.6.1. Fuentes de exposición**

En general, los insecticidas OF son transportados a través del entorno de varias maneras. El malatión lanzado en la atmósfera como resultado de su uso en los cultivos agrícolas y/o áreas residenciales, puede formar gotitas que caen sobre suelos, recursos hídricos, plantas, animales, edificios, y otras estructuras. El insecticida depositado puede ser posteriormente transportado lejos a través de la acción de la lluvia y el viento. Ha sido reportado que el malatión puede permanecer en el ambiente hasta por un periodo de 2 a 12 semanas, pero por lo general se transforma o es degradado en unas pocas semanas a través de los procesos de fotólisis, hidrólisis, y/o biodegradación por los microorganismos. Debido a que el malatión se degrada rápidamente por las bacterias del suelo, se espera que concentraciones bajas puedan estar presentes en el agua subterránea (ATSDR, 2008). En el suelo la vida media que puede estar presente es de 1 a 17 días. En el agua se estimaron las vidas medias de malatión de 1.65 días a pH 8.16 y de 17.4 días a pH 6.0 (Wang, 1991). El malatión puede ser transportado en el aire después de su aplicación en cualquiera de las zonas agrícolas o urbanas/residenciales. Puede ser transportado en la atmósfera en forma de vapor o adsorbido en las partículas y es fotodegradado cuando se expone a la irradiación por máximo de 1.5 h (Bossan et al, 1995).

## ***1.7. TOXICOCINÉTICA***

### **1.7.1. Absorción y distribución del malatión**

La absorción de malatión se produce a través del tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y la piel. La ingestión de alimentos contaminados o el agua son la principal vía de exposición al malatión para la población en general, en comparación con las rutas de inhalación y dérmica la cual es la vía predominante de exposición para la población



ocupacionalmente expuesta. Aunque es bien conocido que el malatión se absorbe rápidamente a través del tracto gastrointestinal y la piel, se sabe poco sobre su destino a partir de la exposición por inhalación. En cualquiera de las vías de exposición, el malatión es transportado por la sangre y se distribuye a muchos órganos y tejidos, incluyendo el hígado donde se biotransforma para formar malaoxón. En los sistemas biológicos, el malatión y sus metabolitos tienen un potencial muy bajo de acumulación y se eliminan por la orina en unos pocos días. Su concentración en los tejidos y fluidos corporales es biomarcador importantes de su exposición. La absorción dérmica del malatión es rápida, sin embargo, su tasa de absorción depende en gran parte de la dosis aplicada y el lugar de exposición (ATSDR, 2008). A partir de un estudio que examinó los índices de absorción de aplicación en varias partes de la piel (antebrazo, axila, pie, el abdomen, la frente, y ángulo de la mandíbula) en algunos varones voluntarios, se encontró que la mayor tasa de absorción es por la axila, seguida de la frente, respectivamente, mostraron 4.2 y 3.4 veces mayor absorción de la piel del antebrazo (Maibach et al, 1971). El malatión restante se detectó en las heces, sangre, intestinos, hígado y riñones (Zeid et al, 1993).

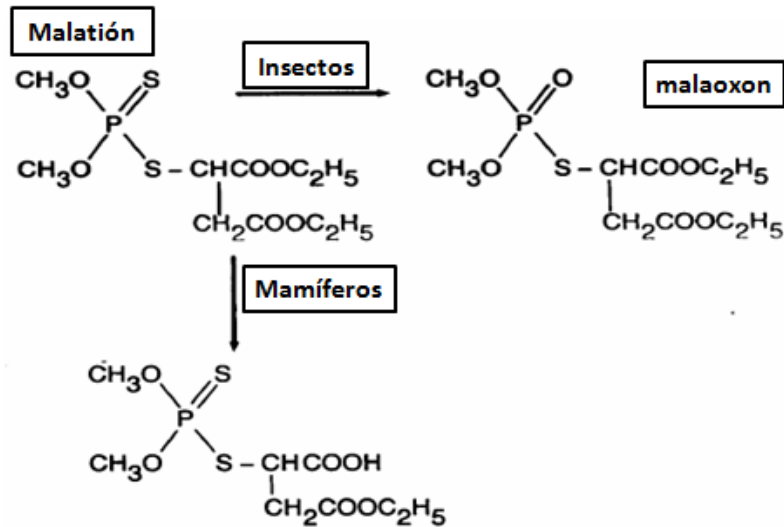
### **1.7.2. Modo de acción**

Los plaguicidas OF incluyendo el malatión comparten un modo de acción común, que es por la inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE); este fenómeno ocurre en las sinapsis nerviosas, en donde la AChE actúa como neurotransmisor en la membrana postsináptica a la que despolariza. Los compuestos OF actúan inhibiendo a la actividad de la acetilcolinesterasa en el sitio preciso en donde ésta rompe a la molécula de acetilcolina. Por lo tanto, se genera gran cantidad de impulsos a las células efectoras y esta

estimulación continua causa las manifestaciones de esta intoxicación (CICOPLAFEST 2002).

Los efectos causados por la toxicidad del malatión incluyen inquietud, hiperexcitabilidad, convulsiones, visión borrosa, salivación, dificultad para respirar, opresión en el pecho, diarrea, vómitos, sudoración, dolores de cabeza y calambres (ATSDR, 2008; Winter, 2003). Además, los signos y síntomas de toxicidad del malatión son diferentes en mamíferos e insectos, porque en mamíferos la AChE no está activa en el sistema nervioso central, sino más bien en los nervios que conectan con los músculos (Ware, 2000). Sin embargo, se sabe que para los mamíferos resulta sólo ligeramente tóxico porque es rápidamente degradado por enzimas carboxilesterasas que hidrolizan al malatión y a sus metabolitos en compuestos no tóxicos y que pueden ser eliminados fácilmente. La bioactivación del malatión a malaoxón por el citocromo P450 es más significativa en insectos, mientras que la detoxificación hidrolítica se produce en mamíferos, de allí su efecto selectivo sobre los primeros (Jonakovic, 2001) (Figura 2).

En los humanos, las carboxilesterasas no se encuentran en la sangre, pero están presentes principalmente en el hígado, que constituye el principal órgano de biotransformación. En las ratas, se han encontrado en varios órganos incluyendo el hígado, suero, y riñón (ATSDR, 2008).



**Figura 2.** El malatión es biotransformado y/o degradado en forma diferente en insectos que en mamíferos.

En circunstancias normales, la AChE se une al neurotransmisor acetilcolina (ACh) en la unión del nervio postsináptico. La toxicidad es generalmente el resultado de la unión de la AChE al malaoxón (metabolito de malatión), que conduce a la acumulación de ACh en el nervio y la posterior sobreestimulación del sistema nervioso (Reigart y Roberts, 1999). El malaoxón, es un metabolito tóxico del malatión, que se produce en el hígado como resultado de un proceso de biotransformación que implica una sulfuración oxidativa catalizada por la enzima del citocromo P450 (Costa, 2008).

La acumulación de acetilcolina en la unión neuromuscular también provoca una despolarización persistente del músculo esquelético, lo que lleva a temblores, ataxia, debilidad, convulsiones y coma. En el sistema nervioso central, la transmisión neural se interrumpe. La toxicidad por malatión causa una perturbación del funcionamiento del sistema colinérgico, y provoca signos clínicos básicos y síntomas que son similares en los seres humanos y otros mamíferos (ATSDR, 2008). Ambos receptores muscarínicos y

nicotínicos así como los receptores del sistema nervioso central son modulados por la exposición malatión (Reigart y Roberts, 1999).

En los seres humanos, las manifestaciones clínicas de la toxicidad malatión dependen de varios factores, incluyendo la enzima blanco y su sensibilidad, el sitio de interacción en la unión sináptica, la dosis de malaoxón que interactúa con el receptor y la vía de exposición. (ATSDR, 2008; Wagner, 1997).

### **1.7.3. Metabolismo y distribución**

A partir de un estudio in vivo para examinar el metabolismo y la distribución del malatión, diez metabolitos fueron encontrados en la orina y en las heces de las ratas expuestas a malatión. Se han encontrado diez metabolitos que son excretados en la orina, de los cuales el más abundante es el ácido dicarboxílico. Los seres humanos poseen además, en exclusiva, monometil fosfato y dimetil fosfato y en ratas, el ácido tiomálico y el fumarato de monoetilo (Edwards, 2006).

### **1.7.4. Excreción**

La rápida tasa de excreción del malatión en el cuerpo humano es facilitada por la acción de las enzimas carboxiesterasas que catalizan la biotransformación del insecticida y sus metabolitos a productos no tóxicos y solubles en agua que se pueden eliminar fácilmente del cuerpo o de las células. Los artrópodos tales como insectos carecen o poseen un bajo nivel de estas enzimas carboxiesterasas. El malatión administrado por vía oral se excreta en gran cantidad (80 a 90%) en la orina durante las primeras 24 h después de la exposición (Edwards, 2006). El malatión se ha detectado en la leche materna en humanos (Shanghi et al, 2003).

## **1.8. ESTRÉS OXIDANTE**

### **1.8.1. Aspectos generales**

El estrés oxidante (EOx) se define como un desbalance entre la generación de especies prooxidantes y su eliminación, mediante sistemas antioxidantes. En condiciones metabólicas normales, existe un balance de prooxidantes y antioxidantes, manteniendo la homeostasis celular. Cuando se rompe el equilibrio oxido-reducción (redox) intracelular, se produce una excesiva cantidad de especies prooxidantes, provocando alteraciones en la estructura-función en cualquier célula, organismo u órgano especializado. Este desequilibrio hacia la forma oxidada afecta al estado redox general. En particular, este desequilibrio es crítico para la regulación del metabolismo y de algunos factores de transcripción, cuya actividad depende del estado redox en el que se encuentren. Por lo tanto, se reconoce al estrés oxidante como un mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de enfermedades y síndromes (Elejalde, 2011).

### **1.8.2. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno.**

Los radicales libres son especies químicas con uno o más electrones desapareados, lo que ocasiona que estas especies sean altamente reactivas. Esta situación es energéticamente inestable y logran su estabilidad removiendo electrones de otras moléculas, y por lo tanto oxidándolas. Las interacciones anteriores pueden ser de tipo covalente y no covalente. Los radicales libres que reaccionan de manera covalente son llamados compuestos electrofílicos y forman aductos (complejo que se forma cuando un compuesto químico se une a una biomolécula como, ADN o proteínas) con macromoléculas de las células como las proteínas. Las especies reactivas de oxígeno (EROS) establecen enlaces no covalentes con

las estructuras celulares, lo que puede originar reacciones en cadena de tipo redox que producen la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Hicks et al, 2006).

Las EROS pueden tener un origen endógeno o exógeno. Entre las endógenas se encuentran el sistema de transporte electrónico mitocondrial, el sistema oxidativo microsomal, diversas enzimas oxidativas citosólicas peroxisomales, las hemoproteínas y la actividad derivada del proceso de fagocitosis. Entre las fuentes exógenas destacan los xenobióticos, como son los plaguicidas, venenos y toxinas, fármacos, drogas, alcohol, etc. (Halliwell, 1999; Hicks et al, 2006).

Las principales EROS son: el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno, que aunque no es un radical libre como tal, los genera fácilmente. Algunas de ellas surgen por reacciones secundarias entre las biomoléculas o entre la desactivación de xenobióticos, otras se generan por efecto de radiaciones ionizantes o se generan con un fin fisiológico como es el caso de la fagocitosis (Venereo, 2002).

### **1.8.3. Efectos dañinos de las EROS**

La formación de las EROS pueden causar daño oxidante el cual se ha visto implicado en la etiología o patología de múltiples enfermedades, ya que pueden dañar macromoléculas como el ADN, carbohidratos, proteínas y lípidos, dando como resultado un daño celular (Anderson et al, 2008). El daño oxidante en el ADN puede ocurrir a nivel estructural como mutaciones de pares de bases, rearrreglos, deleciones, inserciones y amplificaciones de secuencia y rompimientos de las cadenas, daños a genes supresores de tumores como *p53* y la amplificación de la expresión de protooncogenes, así como la inducción de la transformación maligna de células en cultivo.

La acumulación del daño al ADN ha sido asociada con el proceso de envejecimiento (Genestra, 2007). Las reacciones químicas de los radicales libres se producen constantemente en la células y son necesarias para la salud, en el ser humano son llevadas a cabo en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. El problema se presenta cuando el organismo tiene un exceso de radicales libres obtenidos de forma exógena, es decir, por xenobióticos (Russo, 2007).

#### **1.8.4. Peroxidación lipídica.**

Dentro del organismo, las EROS producen peroxidación de los lípidos (LPO) de las membranas celulares y subcelulares, mediante una serie de reacciones en cadena que comienzan cuando las EROS extraen un átomo de hidrógeno de un lípido y originan un radical lipídico, el cual puede reaccionar con otro radical; por ejemplo un  $O_2^{\bullet}$  originando el radical  $ROO^{\bullet}$  e hidroperóxidos lipídicos ( $ROOH^{\bullet}$ ), en la degradación de estos se produce malondialdehído (MDA), etano y pentano entre otros productos finales de la LPO. La terminación del proceso ocurre cuando los  $ROO^{\bullet}$  y  $ROOH^{\bullet}$  se reducen totalmente, reaccionando entre sí o bien en presencia de sistemas antioxidantes de moléculas como glutatión (GSH), las vitaminas C y E, carotenoides y las ubiquinonas (Halliwell, 1999).

La generación de EROS se asocia con diversos efectos en la salud, entre ellos alteraciones en el aparato reproductor tanto femenino como masculino, donde se ha observado que la producción excesiva de EROS comprometen la calidad de los gametos en los individuos (Aitken y Baker, 2006).

## 2. ANTIOXIDANTES

La célula posee mecanismos de defensa para contrarrestar el daño inducido por los radicales libres (RL). Los antioxidantes son moléculas que cuando están presentes a bajas concentraciones en comparación con los sustratos oxidables, previenen o retardan la oxidación de las biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. Existen dos tipos de antioxidantes: enzimáticos y no enzimáticos (Agarwal et al, 2005).

### 2.1. *Antioxidantes enzimáticos*

Los antioxidantes enzimáticos neutralizan la producción excesiva de EROS y evitan que se dañe la estructura celular. Los antioxidantes enzimáticos son: la superóxido dismutasa (SOD), que es considerada como la primera línea de defensa antioxidante en contra de las EROS y que cataliza la dismutación del  $O_2^{\bullet}$  y las peroxidasas como catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) que reducen el  $H_2O_2$  a agua y oxígeno. La GPx elimina hidroperóxidos transformando el glutatión reducido (GSH) en glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y glutatión reductasa (GR) que es una flavoenzima que se encarga de regenerar el GSH a partir de la reducción del GSSG utilizando como fuente de electrones a la coenzima NADPH. La enzima glutatión S transferasa (GST) es la encargada de detoxificar compuestos xenobióticos catalizando la reacción con el grupo -SH del GSH, neutralizando de esta forma sus sitios electrofílicos y generando productos más solubles en agua (Halliwell, 1999; Agarwal et al, 2005).

Otra enzima esencial para prevenir el daño oxidativo, es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que cataliza la primera reacción del mecanismo de la vía de las pentosas fosfato siendo la responsable de la producción del NADPH, el cual es requerido para la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) y mantener los niveles de GSH en



la célula, además el NADPH es la donante de electrones fundamental para un número importante de reacciones enzimáticas. Algunas de estas reacciones, como por ejemplo, la catalizada por la enzima GR, es esencial en la protección de la célula contra el estrés oxidante.

La G6PD está presente en todos los organismos vivos; incluyendo procariotas, hongos, protozoarios, plantas y animales. La actividad enzimática normal de la G6PD es vital para todas las células del organismo, especialmente para los eritrocitos cuya deficiencia o disminución de su actividad, reduce considerablemente la vida media de los glóbulos rojos ocasionando anemia hemolítica, el cual es un desorden hereditario ligado al cromosoma X (Acosta et al, 2012).

## ***2.2. Antioxidantes no enzimáticos***

Los antioxidantes no enzimáticos son aquellos compuestos que donan sus electrones a los RL, neutralizándolos y evitando reacciones en cadena. Son conocidos como antioxidantes sintéticos o suplementos dietéticos e incluyen a las vitaminas C y E, el selenio, el zinc, la taurina, la hipotaurina, el glutatión, el beta caroteno, y los polifenoles. La taurina, hipotaurina y la transferrina se encuentran principalmente en las trompas de Falopio y en el fluido folicular donde protegen al embrión del EOx (Agarwal et al, 2005).

En el presente estudio se usó el antioxidante trolox (2-ácido carboxílico-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano) el cual es un análogo soluble del  $\alpha$ -tocoferol, y es superior a éste por que puede incorporarse tanto en los compartimentos acuosos como en los lipídicos. Funciona como un atrapador de radicales libres y un inhibidor de la LPO. El radical trolox fenoxil, resultado de la donación de un hidrógeno del trolox a un radical libre, es relativamente estable y puede regenerarse por ácido ascórbico (Messier et al, 2013).

### ***2.3. EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDANTE EN LA REPRODUCCIÓN DE LA HEMBRA***

En un organismo sano, las EROS y los antioxidantes permanecen en equilibrio, y cuando éste se altera debido por lo regular a un exceso de EROS, se presenta EOx, el cual influye de manera importante en la vida reproductiva de las hembras. Las EROS pueden afectar a múltiples procesos fisiológicos, desde la maduración de los ovocitos a la fecundación, el desarrollo del embrión y la gestación (Ruder et al, 2008).

Se ha sugerido que el EOx modula la declinación relativa de la vida fértil; desempeña un papel importante durante la gestación, el parto normal y en la iniciación de un parto prematuro. Los problemas ováricos pueden ser una causa de EOx, el cual representa un papel muy importante en la fisiopatología de la infertilidad (Ruder et al, 2008).

El ovario es un órgano metabólicamente activo y por lo tanto, está continuamente sujeto a una variedad de agentes que pueden provocar estrés. Durante la ovulación, las EROS tienen un papel fisiológico similar a algunos aspectos en la inflamación ya que la ovulación es suprimida por agentes que inhiben las reacciones inflamatorias agudas. Como las EROS se generan durante el proceso inflamatorio, es razonable suponer que se formen durante la ovulación. (Fujii et al, 2005).

En la mujer, como consecuencia de la actividad hormonal en la pubertad, un número de ovocitos primarios comienzan a crecer cada mes, pero sólo uno de ellos llega a la maduración. El metabolismo aeróbico es esencial para los requerimientos energéticos de los gametos y las EROS tienen un papel importante en la fisiología del ovario. Durante la fase preovulatoria del folículo de Graaf hay una intensa LPO y la enzima GSH-Px ayuda a mantener niveles bajos de EROS dentro del folículo, lo que sugiere que el EOx tiene un papel importante en la función ovárica. En el folículo en crecimiento, el incremento en la

producción de esteroides causa un aumento del citocromo P450 que genera EROS y se considera que estos eventos son inductores de la ovulación. Se ha sugerido que en el ovario hay una compleja relación entre EROS y antioxidantes (Agarwal et al, 2012).

En la mujer, únicamente uno de los ovocitos en crecimiento reanuda la meiosis I, este proceso es dirigido por un incremento de EROS e inhibido por antioxidantes. En tanto que el progreso hacia la metafase (MII) es inducida por antioxidantes. Las EROS y las enzimas antioxidantes Cu-ZnSOD, MnSOD y GSH-Px tienen un papel muy importante en la maduración de los ovocitos, la ovulación y la función lútea en el ovario. Las enzimas antioxidantes GSH-Px y la MnSOD son marcadores de la maduración citoplásmica ya que éstas se expresan únicamente en los ovocitos que están en MII. (Agarwal et al, 2012; Ruder et al, 2008).

### **3. ANTECEDENTES**

#### ***3.1. EFECTOS SOBRE LA SALUD***

Los insecticidas OF como el malatión provocan alteraciones en las funciones del corazón, hígado y riñón en diversos estudios realizados en roedores. Estudios realizados en humanos los relacionan con defectos congénitos. Provocan cáncer de mama y tumores en los testículos, y numerosos estudios han demostrado que son genotóxicos (Berger y Horner, 2003; Cavieres, 2004).

##### **3.1.1. Efectos hematológicos**

A dosis elevadas, el malatión puede interferir con el funcionamiento normal del sistema inmune en algunas especies animales y afectar al sistema hematopoyético (Dean y Murray, 1991). Otros estudios indican que la exposición crónica al malatión disminuye

significativamente los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina. Estudios similares han demostrado que altos niveles de malatión producen una disminución en la inmunidad y causar linfoma de Hodgkin (Cantor et al, 1992). Un tratamiento agudo con malatión provocó insuficiencia de la médula ósea y anemia aplásica (Zham et al, 1993).

### **3.1.2. Estudios de genotoxicidad**

El malatión ha sido identificado por el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) como un agente mutágeno (NIOSH, 2002). Muchas otras investigaciones han demostrado que la exposición a malatión, o sus metabolitos malaoxón, e isomalatión inducen alteraciones genéticas en linfocitos humanos (Blasiak et al, 1999; Pluth et al, 1998).

### **3.1.3. Efectos en la reproducción**

Altas dosis de malatión inducen efectos dañinos sobre el desarrollo y reproducción en animales de experimentación (Saadi et al, 2008). Otro estudio indicó que el malatión y sus metabolitos pueden atravesar la placenta de los mamíferos y deprimir la actividad de la colinesterasa en el feto (TOXNET, 1992).

Varios estudios demuestran que el malatión tiene efectos nocivos para la salud reproductiva, estudios in vivo en animales, han revelado que el malatión tiene efectos dañinos sobre la población de las células germinales y células de Sertoli. Además, se han descrito alteraciones producidas por el malatión en reducir los niveles de testosterona, lo que sugiere alteraciones en las células de Leydig o cambios en el metabolismo de testosterona en el testículo de rata (Trentacoste et al, 2001).

En un estudio realizado en hombres ocupacionalmente expuestos a una mezcla de plaguicidas OF, como el diazinón se observó que la estructura de la cromatina espermática

presentaba alteraciones en la mayor parte de las muestras de semen estudiadas y presentaban un potencial bajo de fertilidad. Esto sugiere que los plaguicidas OF alteraron la cromatina espermática, lo que produce una disminución en el número de células y una alta susceptibilidad del ADN a la desnaturalización; se han demostrado varios tipos de lesiones del ADN como un resultado del daño oxidante al espermatozoide, que incluyen aberraciones cromosómicas y la oxidación de las bases (López et al, 1998; Twigg et al, 1998). La cromatina espermática es un blanco sensible al efecto de los OF lo cual puede producir efectos adversos en la reproducción (Sánchez et al, 2004).

Otros estudios in vitro sobre el efecto del malatión en diferentes etapas reproductivas en gametos utilizando como modelo el porcino, muestran que puede tener efectos nocivos en la reproducción, entre los cuales se mencionan daños en la maduración y viabilidad de los ovocitos expuestos durante 44 h en concentraciones de 57  $\mu\text{M}$  (Casas et al, 2010). Para estudiar el efecto del malatión en la fertilización, los gametos porcinos se coincubaron por 7 h en presencia de concentraciones crecientes de malatión (50, 100 y 500  $\mu\text{M}$ ), y para el desarrollo embrionario temprano, los cigotos se cultivaron en el medio de desarrollo en presencia del insecticida. El malatión disminuyó significativamente el índice de viabilidad, fertilización y del desarrollo embrionario dependiente de la concentración (Ducolomb et al, 2009).

También se ha estudiado el efecto del malatión en la expresión génica durante el desarrollo embrionario temprano, para la cual se sometió a los ovocitos de cerdo a una concentración subletal de 200  $\mu\text{M}$  del insecticida después de la fertilización. Esto disminuyó en un 50% la formación de mórulas, y al realizar un análisis diferencial de la expresión génica, se pudo observar una disminución en la expresión de al menos 11 genes, tanto mitocondriales como nucleares (Salazar et al, 2007). Para evaluar el efecto del malatión en la ovogénesis

temprana, se cultivaron ovarios fetales de ratón en presencia del insecticida por 24 h y se determinó que la viabilidad disminuye significativamente. Además, al analizar los cambios en la expresión génica de estos ovocitos mediante la generación de genotecas de cDNA, se demostró que el malatión en concentración de 250  $\mu\text{M}$  altera la regulación de varios genes involucrados en la transcripción (BP75), traducción (proteína ribosomal 5S) y función mitocondrial (citocromo oxidasa, unidades I y III) (Bonilla et al, 2008). En espermatozoides expuestos a 500  $\mu\text{M}$  de malatión, después de una hora de tratamiento se observó disminución en su viabilidad y motilidad progresiva (Betancourt et al, 2006).

### ***3.2. EFECTOS DEL MALATIÓN SOBRE EL EOx***

Los insecticidas OF han sido implicados en la generación de EOx que produce efectos dañinos en la salud reproductiva. Se han hecho estudios sobre el efecto del EOx producido por el malatión en células somáticas pero no existen estudios que demuestren este efecto en ovocitos o a nivel reproductivo. Hay estudios que demuestran una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, en combinación con una mayor generación de LPO (Agarwal et al, 2012).

En eritrocitos de ratón se ha reportado que el malatión tiene potencial para inducir la LPO de las membranas celulares a través de diversos procesos bioquímicos, y las concentraciones de malondialdehído se incrementaron significativamente, mientras que la actividad de SOD y la GSH-Px disminuyeron de manera significativa. Esto indica que la disminución de estas enzimas es una respuesta para evitar la LPO producida por el malatión (Yarsan et al, 1999).

La mayoría de los estudios experimentales se han realizado en ratas. Al administrar malatión intraperitonealmente y evaluar tanto el efecto agudo, como el crónico del

insecticida, se ha observado que éste produce EOX en el cerebro, incrementando los niveles de LPO y se detectó la presencia de grupos carbonilo, además la actividad de las enzimas SOD y CAT disminuyeron significativamente (Brocardo et al, 2005; Fortunato et al, 2006; Ranjbar et al, 2010). También se ha visto que el malatión produce EOX en riñón y pulmón (Possamai et al, 2007), en saliva y plasma sanguíneo (Abdollahi et al, 2004), suero e hígado (Ahmed et al, 2000; Akhgari et al, 2003; Rezg et al, 2008).

En roedores se ha señalado el efecto protector de la vitamina E y del selenio contra el EOX inducido por el malatión en hígado después de una exposición crónica por 45 días. Se demostró además un incremento en los niveles de LPO y una reducción en GSH, así como en las enzimas antioxidantes: GPx, SOD y CAT (Mourad et al, 2011).

En el pez de la especie *Carassius auratus gibelio*, se demostró que el malatión induce alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidante y provoca LPO en riñón, branquias e intestino (Huculeci et al, 2008). Se ha mostrado que en trabajadores agrícolas expuestos a malatión, aumentan los niveles de las EROS en los eritrocitos (Datta et al, 1994; Durak et al, 2009) y los linfocitos (Muniz et al, 2008). También se observó un aumento en la LPO en una línea celular de carcinoma de hígado HepG<sub>2</sub> expuestas a malatión (Moore et al, 2010).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años se ha incrementado el uso de sustancias químicas, como los plaguicidas, ya sea para uso doméstico o para la aspersion de los campos de cultivos agrícolas para el control de plagas. El empleo de estos plaguicidas ha desencadenado una gran contaminación del ambiente que puede dañar a los seres humanos, otros animales y plantas.

En años recientes ha cobrado importancia el enfoque que se está dando al efecto que los plaguicidas pueden tener en la salud reproductiva de los mamíferos. En los países industrializados los plaguicidas se aplican del 85 al 100% en los principales cultivos.

Sin embargo, existen pocos trabajos encaminados a conocer los mecanismos de toxicidad inducidos por los plaguicidas en las funciones reproductivas y su asociación con el EOx.

En México se emplean altos volúmenes de plaguicidas, entre los que se encuentran los insecticidas OF, ya que en el 2009 se comercializaron 4.7 millones de toneladas para el uso agrícola y doméstico, constituyendo un riesgo para la salud humana. (Información del sector agroalimentario, del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP, 2009). Aunque ya se han realizado estudios sobre el efecto tóxico de los insecticidas OF la mayoría de ellos evalúan su efecto sobre las células somáticas y en los estudios en los que se analiza su efecto en las funciones reproductivas, la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo *in vivo*.

La importancia de realizar estudios de toxicología reproductiva *in vitro*, radica en la necesidad de conocer los mecanismos por los cuales diversos xenobióticos, entre ellos, insecticidas OF como el malatión, afectan el proceso de maduración de los ovocitos, fertilización y desarrollo embrionario. Existen pocos estudios llevados a cabo en espermatozoides pero no hay suficientes estudios *in vitro* en ovocitos que permitan conocer los mecanismos por los cuales estos compuestos OF están actuando. Por tal motivo se requiere de más estudios para determinar los mecanismos particulares por los cuales el insecticida malatión ejerce el efecto observado, ya que la maduración normal del ovocito es un prerequisite crítico para que eventos posteriores como la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, ocurran de modo normal. El EOx se ha propuesto como uno de los mecanismos importantes de toxicidad por la exposición a malatión. Los sistemas



enzimáticos pueden convertir los malati3n en intermediarios altamente reactivos, metabolitos y generar productos secundarios, como EROS (Datta et al, 1994; Fortunato et al, 2006). Las EROS pueden afectar diversas funciones en el aparato reproductivo y causar patologías que afectan su funci3n. El medio oxidante puede influir en el desarrollo embrionario temprano por la modificaci3n de factores de transcripci3n clave y la alteraci3n de la expresi3n g3nica. Altas concentraciones de EROS pueden tener un papel importante, tanto en la maduraci3n, como en la fertilizaci3n y el desarrollo embrionario de los ovocitos (Agarwal et al, 2005).

La alteraci3n de la funcionalidad de los gametos por la presencia de grandes cantidades de EROS, es motivo de gran inter3s y preocupaci3n en el tema de la reproducci3n animal, tanto en hembras como en machos. Adem3s, el efecto observado en un estudio in vitro podría sugerir que los mismos procesos ocurren en el organismo. El porcino se toma como modelo ya que presenta aspectos fisiol3gicos, anat3micos, bioquímicos y endocrinos similares al humano. El uso de gametos de cerdo in vitro como modelo para estudios toxicol3gicos es adecuado para evaluar el efecto de los plaguicidas en la maduraci3n de los ovocitos, la interacci3n de los gametos durante la fertilizaci3n y el desarrollo embrionario temprano. (Campagna et al, 2001; Campagna et al, 2002; Gil et al, 2010; Ducolomb et al, 2009).

## **5. PREGUNTAS DE INVESTIGACI3N**

- a) ¿El estr3s oxidante es uno de los mecanismos por el cual el malati3n afecta la maduraci3n in vitro de los ovocitos?

- b) ¿Cuáles mecanismos bioquímicos se ven afectados por el malatión, durante la maduración in vitro de los ovocitos porcinos?

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Determinar el efecto del malatión en los parámetros de estrés oxidante en los COCs y su relación en la maduración in vitro de los ovocitos porcinos.

#### **6.1.1. Objetivos particulares**

- 1) Determinar la CL<sub>50</sub> en COCs y la CIM<sub>50</sub> en ovocitos, expuestos a malatión.
- 2) Evaluar el contenido de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GSH-Px, GST y G6PD en los COCs expuestos a malatión durante la maduración.
- 3) Determinar los parámetros de estrés oxidante (EROS, LPO y oxidación de proteínas), en los COCs expuestos a malatión durante la maduración.
- 4) Evaluar al estrés oxidante como uno de los mecanismos de daño en la maduración de los ovocitos expuestos a malatión.

## **7. HIPÓTESIS**

Considerando las evidencias en las que se ha demostrado que el malatión produce estrés oxidante en células somáticas de humanos y otros mamíferos, entonces el malatión provocará un incremento de EROS y una alteración de las enzimas antioxidantes en los COCs, lo cual impactará en la maduración in vitro de los ovocitos porcinos.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***8.1. Maduración in vitro.***

A menos de que se indique otra cosa, todos los reactivos, incluyendo el malatión, fueron de la marca Sigma (Sigma Chemical Company, St Louis, MO EUA). Los reactivos y las soluciones se esterilizaron mediante filtración con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  Millex-GV (Millipore). Todas las técnicas se realizaron bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar (Veco, México) y todos los procedimientos de incubación se llevaron a cabo a 38.5°C con 5% de CO<sub>2</sub>, y humedad a saturación. Los medios empleados, se conservaron a 4°C y se usaron en no más de 21 días después de su preparación; los medios se suplementaron 5 h antes del cultivo y se preincubaron en las condiciones antes mencionadas para equilibrar el pH y la temperatura. Como control positivo del estrés oxidante se empleó (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250  $\mu\text{M}$ ) (Eichenlaub-Ritte et al, 2010).

La técnica de maduración in vitro (MIV) de ovocitos porcinos y la preparación de los medios de cultivo se realizaron de acuerdo con el método de Abeydeera et al, (1998).

### ***8.2. Colección de los Complejos Ovocitos-Células del Cúmulo***

Los ovarios se colectaron de cerdas de seis meses de edad, recién sacrificadas en el rastro (Los Arcos, los Reyes, Edo. de México) y se transportaron en un tiempo no mayor de 2 h al laboratorio a 25°C, en solución de NaCl al 0.9% con un pH de 7.3 a 7.4. Una vez en el laboratorio se lavaron por lo menos tres veces con la misma solución. Los folículos se puncionaron utilizando una aguja hipodérmica de 18 x 38 mm unida a una jeringa desechable de 10 ml (Becton Dickinson, México) para la obtención del fluido folicular porcino.

Se seleccionaron los folículos de 3 a 6 mm de diámetro para la obtención del fluido folicular; éste se colocó en un tubo de 50 mL y el paquete celular se dejó sedimentar durante 15 a 20 min.

El sobrenadante se desechó y al paquete celular se le adicionaron 20 mL de medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio, HEPES (2.38 g/L) y PVA (0.29 g/L) (TL-HEPES-PVA) a un pH de 7.3 a 7.4 y se dejó sedimentar durante 15 min; este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, el paquete celular se depositó en una caja de Petri de 90 mm de diámetro (S y M Laboratorios, México) con 20 mL del mismo medio. Bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZ60, Olympus Optical, Japón) se aspiraron los COCs con una pipeta Pasteur estéril, adelgazada por calor en forma manual, con la que se hizo una micropipeta de tal manera que pudieran pasar a través de ella los COCs sin dañarse. Se eligieron aquellos COCs que presentaron un ovocito con citoplasma uniforme y que estuvieran rodeados por una masa compacta de por lo menos tres capas de CC.

La maduración de los COCs se llevó a cabo en un medio para maduración definido, libre de proteínas preparado con medio TCM 199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (2.2 g/L) (In vitro, México) suplementado con PVA al 0.1%, D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y EGF 10 ng/mL (Wang y Niwa, 1995).

Los COCs seleccionados se lavaron 3 veces en una caja de Petri estéril de 35 mm de diámetro (Nunc), que contenía una gota de 500 µL de medio de maduración. En una caja estéril de 4 pozos (Nunc) se depositaron 50 COCs por cada pozo en una gota de 500 µL de medio de maduración. Inmediatamente antes de la incubación se agregaron 0.5 µg/mL de FSH y LH respectivamente. Los COCs se incubaron durante 44 h.

### ***8.3. Tratamiento con malatión***

Para evaluar el efecto del insecticida en la viabilidad, la maduración y todos los indicadores de EOx en los COCs, se usó malatión de grado reactivo. Se preparó una solución stock de 10 mM en DMSO al 1%. Para los experimentos de MIV se usaron concentraciones de 0 (control), 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 3000  $\mu\text{M}$  de malatión por pozo con un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  de medio de maduración. Los COCs permanecieron en contacto con el insecticida durante las 44 h de incubación.

Previamente, se realizaron ensayos de viabilidad y MIV con la concentración más alta del diluyente (DMSO al 1%) para descartar su efecto sobre los parámetros antes mencionados.

### ***8.4. Tratamiento con trolox***

Para determinar el efecto antioxidante del trolox se preparó una solución stock (5 mM) en etanol absoluto y se hicieron los siguientes grupos, cada uno con cincuenta COCs por pozo con de 500  $\mu\text{L}$  de medio de maduración en cajas de 4 pozos: 1) Sin trolox ni malatión (control); 2) COCs expuestos a 750 y 1000  $\mu\text{M}$  de malatión respectivamente. 3) COCs con un pre-tratamiento de 30 min con trolox (50  $\mu\text{M}$ ) seguido de la exposición a las dos concentraciones de malatión mencionadas; 4) COCs expuestos únicamente a la misma concentración de trolox. Todos los grupos se incubaron durante las 44 h de MIV.

### ***8.5. Evaluación de la viabilidad de los COCs y la MIV de los ovocitos***

La viabilidad y la maduración se evaluaron en los COCs de manera independiente, después de 44 h de iniciada la MIV.

La viabilidad de los COCs se evaluó por dos tinciones. La primera con cristal violeta que fue determinada mediante espectrofotometría (Nakagawa et al, 1996). La segunda tinción

fue con azul de tetrazolio (MTT), la cual se usó para confirmar los resultados de la primera tinción. Después de la MIV, los COCs fueron lavados en medio TL-HEPES e incubados con 0.5 mg/mL de MTT durante 1 hora para evaluar la viabilidad con un microscopio estereoscópico (Olympus SZ60, Olympus Optical, Japón) a 400 X. Los COCs que presentaron tanto el ovocito como las CC teñidos de color púrpura se consideraron vivos y los incoloros como muertos. (Casas et al, 2010).

Para evaluar la maduración de los ovocitos se realizó la denudación de los COCs desprendiendo las CC por acción mecánica, utilizando una micropipeta de 2-200  $\mu$ L. Se lavaron y se incubaron posteriormente con 300  $\mu$ L de Bisbenzamida (Hoechst 33258), la caja se cubrió con papel aluminio y se dejó durante 45 min en oscuridad a 4°C. Transcurrido este tiempo, los ovocitos se lavaron de 2 a 3 veces en gotas de 500  $\mu$ L de PBS, para eliminar el exceso de Hoechst y finalmente los ovocitos se colocaron en otra caja y se fijaron con una solución de glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, con una pipeta Pasteur adelgazada se tomaron 15 ovocitos, se transfirieron a un portaobjetos (Fisherbrand. Fisher Scientific P.A. EUA), se cubrieron con 20  $\mu$ L de medio de montaje (Glicerol-PBS 7:3), y se colocó un cubreobjetos; la preparación se selló con esmalte de uñas. Las muestras se guardaron en un lugar oscuro a 4°C hasta el momento de la evaluación.

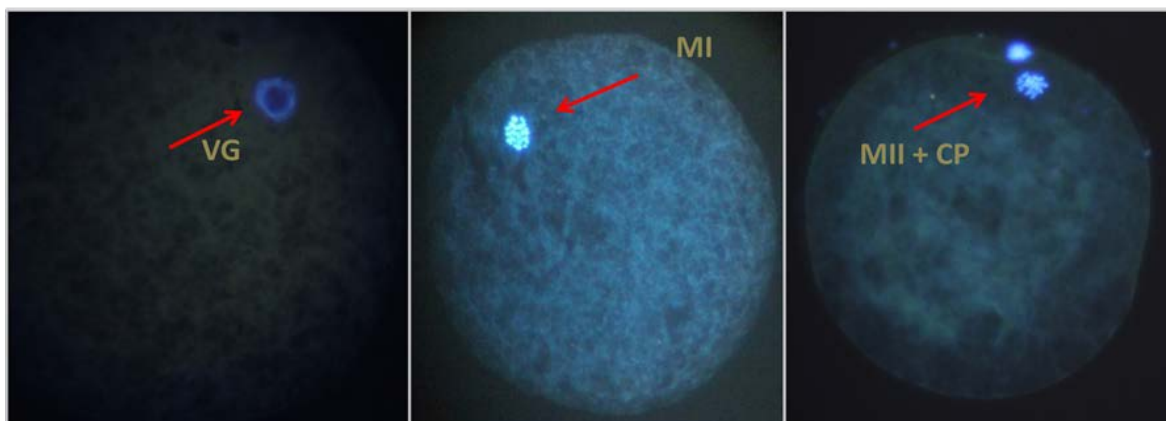
La maduración de los ovocitos se analizó utilizando un microscopio de Epifluorescencia (Zeiss, modelo Axioscop plus) y un filtro de fluorescencia con rango de excitación para luz ultravioleta 482 nm a 400 X.

Los ovocitos se clasificaron de acuerdo a los siguientes criterios (Abeydeera et al, 1998; Hunter y Polge, 1966; Vatzias y Hagen, 1999):

**Inmaduros:** los ovocitos que mostraron vesícula germinal (VG).

**En vías de maduración:** los que presentaron cromosomas en metafase I (MI).

**Maduros:** los ovocitos con cromosomas en metafase II (MII) y el primer cuerpo polar (Figura 3).



**Figura 3.** Para evaluar el estado de maduración, la cromatina se tiñó con Hoechst. VG: ovocitos inmaduros; MI: ovocitos en vías de maduración; MII+CP: ovocitos maduros con cuerpo polar. Las muestras se observaron en microscopio de fluorescencia 400 X.

## ***8.6. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDANTE***

De acuerdo a resultados preliminares de viabilidad y maduración, las concentraciones de 0, 750 y 1000  $\mu\text{M}$  de malatión fueron empleadas para evaluar los distintos parámetros de estrés oxidante como determinar la generación de EROS, la oxidación lípidos y proteínas y la expresión de las enzimas antioxidantes en los COCs expuestos al insecticida durante las 44 h de MIV.

### **8.6.1. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno**

La cantidad de EROS se evaluó en los COCs, con los diferentes tratamientos en placas de 96 pozos oscuras, estériles y especiales para fluorescencia.

El contenido de las EROS fue estimado usando 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), que es desesterificado por la presencia de peróxidos produciendo una molécula más oxidada (2',7'-diclorofluoresceína o DCF), la cual es capaz de emitir fluorescencia. El DCF posee como propiedades una longitud de excitación a 488 nm y una longitud de emisión de fluorescencia máxima a los 520 nm (Gomez-Quiroz et al, 2008). Después de las 44 h de iniciada la MIV con los distintos tratamientos, el DCFH fue añadido a todos los cultivos a una concentración final de 5  $\mu$ M por 30 min, e inmediatamente se comenzó la lectura de fluorescencia en el espectrofotómetro DTX 880 multimodal detector (Beckman Coulter), con las longitudes de onda de 488 nm de excitación y 520 nm de emisión, los resultados se expresaron como intensidad de la fluorescencia.

### **8.6.2. Análisis del contenido de proteína por Western blot**

El contenido de las cinco enzimas antioxidantes: CuZn-SOD, CAT, GSH-Px, G6PD y GST, se determinó mediante la técnica de Western Blot de acuerdo con el método descrito por Valdes-Arzate et al., (2009).

Cien COCs se colocaron en la solución de lisis que contenía inhibidor de proteasas (Complete Mini)/phosphatase inhibitor (PhosSTOP) cocktail (Roche). Veinte  $\mu$ g de proteína del lisado de los COCs fueron sometidos a una electroforesis en geles de poliacrilamida (Criterion polyacrylamida geles al 4 a 20%) (Bio-Rad) en condiciones reductoras y posteriormente fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad).



La presencia de las proteínas transferidas a la membrana se verificó con la tinción de Rojo Ponceau. Las membranas fueron bloqueadas durante 90 min con 5% de leche libre de grasa (Svelty, Nestlé) en solución amortiguadora Tris (TBS) a pH 7.4 con detergente Tween 20 (TTBS). Las membranas fueron lavadas en tres tiempos de 10 min en TBS y se dejaron 12 h a 4 °C en incubación con los siguientes anticuerpos primarios: cabra anti-SOD, cabra anti-CAT, cabra anti-GPx (todos a una dilución de 1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology), conejo anti-GST (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) y conejo anti-G6PD (1:500) (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente las membranas se incubaron durante 1 hora con los siguientes anticuerpos secundarios: ratón anti-cabra (1:8000) (Santa Cruz Biotechnology) y anti-conejo IgG (1:8000) (GE Healthcare). Tanto el anticuerpo primario como el secundario fueron diluidos en TTBS, y todas las etapas de incubación se realizaron a temperatura ambiente en agitación suave excepto la incubación con el anticuerpo primario que fue a 4 °C.

La inmunoreacción fue detectada usando el “Immobilon™ Western enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Millipore)”. Las imágenes fueron obtenidas mediante el equipo Kodak Imagen Gel Doc. La  $\beta$ -actina se usó para normalizar la concentración de proteína. La intensidad de las bandas se cuantificó usando el programa “Kodak Image Gel Doc software” (v 3.1).

### **8.6.3. Determinación del contenido de proteínas**

La concentración de las proteínas se determinó usando el kit de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante, en un extracto de proteína de cien COCs, en 100  $\mu$ L de buffer de lisis.

Brevemente, se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l del lisado celular de las muestras y se agregaron 200  $\mu$ l de reactivo BCA diluido 1:50 en  $\text{CuSO}_4$ , al mismo tiempo se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina de 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ , todo se incubó por 10 min a 95° C. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (DTX880, Beckman Coulter) y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de albúmina.

#### **8.6.4. Determinación de la oxidación de proteínas**

Para evaluar la oxidación de las proteínas se detectó la presencia de grupos carbonilos mediante la técnica de Oxyblot, utilizando el kit de detección de la oxidación de proteínas “Oxyblot™ Protein Oxidation Detection Kit” (Millipore). Se realizó una derivatización del grupo carbonilo con 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH), detectando como resultado hidrazona con un anticuerpo primario anti-DNP.

Se obtuvieron los lisados celulares de 100 COCs por tratamiento en alícuotas de 20  $\mu\text{g}$  de proteínas y se incubaron con SDS al 12% en una solución con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) durante 10 min a temperatura ambiente. El DNPH interacciona con los grupos carbonilo de las proteínas, originando proteínas derivatizadas con grupos 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP). Las muestras derivatizadas se resolvieron en un gel desnaturante al 12% de poliacrilamida y las proteínas con grupos DNP fueron inmunodetectadas con un anticuerpo que reconoce grupos DNP.

Para esto el kit de OxyBlot™ Protein Oxidation, consta de DNPH, solución neutralizante (solución que reacciona deteniendo la reacción del DNPH a los grupos carbonilos) y los anticuerpos (anti-DNP y anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa). Al formarse un semialdehído glutámico por el ataque de un radical libre en el carbono expuesto del

aminoácido se produce un posterior reordenamiento de la molécula originando un grupo carbonilo, el que no se puede medir, por lo que la carbonilación de proteínas se mide por medio de la derivatización de la muestra.

La presencia de los grupos carbonilo se determinó cualitativamente por la intensidad de la banda sobre la membrana de nitrocelulosa en al menos tres extractos proteicos totales diferentes.

#### **8.6.5. Medición de los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico**

Las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), son subproductos de la peroxidación de lípidos y de otros mecanismos oxidativos. Después de 44 h de maduración en presencia de malatión, se colocaron grupos de 100 COCs por tratamiento en tubos Eppendorff con 100  $\mu$ L de PBS 1X con el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), EDTA y tritón, se homogeneizó muy bien cada muestra y de la suspensión resultante de cada muestra se tomaron 5  $\mu$ L para determinar proteínas por el método de BCA. Al resto se le agregaron 95  $\mu$ L de ácido perclórico al 2.5% y se dejó reposar durante 20 min a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo las muestras se centrifugaron a 13.400 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente los sobrenadantes se pasaron a otros tubos, en baño de hielo. A cada muestra se les agregaron 190  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67%, se agitaron en un vortex y se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 1 hora a 90°C. Transcurrido el tiempo las muestras se dejaron enfriar y se observó una coloración rosa que fue leída por espectrofotometría a 532 nm (Draper y Hadley, 1990).

El contenido de TBARS presente en las muestras se cuantificaron usando una curva patrón generada por concentraciones conocidas de lipoperóxido. La concentración TBARS fue expresada en  $\mu\text{MolesTBARS/mg}$  proteína.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a que los datos eran variables discretas, se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas. La correlación entre las concentraciones del malatión y su efecto en la viabilidad y maduración de los ovocitos, se evaluaron empleando el coeficiente de correlación de Spearman ( $R^2$ ).

Los porcentajes de las etapas meióticas de los ovocitos se compararon con el control mediante la prueba de ji-cuadrada.

La  $CL_{50}$  de los COCs y la  $CIM_{50}$  de los ovocitos se calcularon por una estimación Probit de regresión no lineal.

Una prueba de análisis de varianza seguida de la prueba de Bonferroni se utilizó para analizar los niveles de EROS, TBARS, la oxidación de proteínas y la expresión de las enzimas antioxidantes.

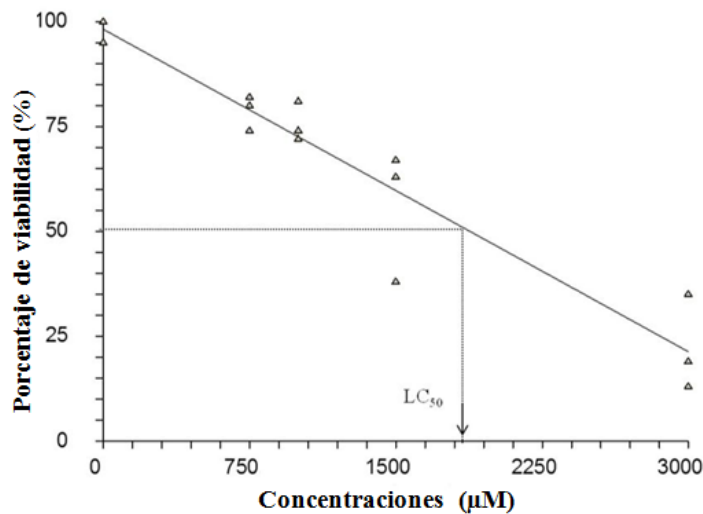
Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism, versión 6.0 y el paquete estadístico NCSS 2007.

Las pruebas estadísticas se aplicaron con un nivel de confianza ( $p < 0.05$ ). Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

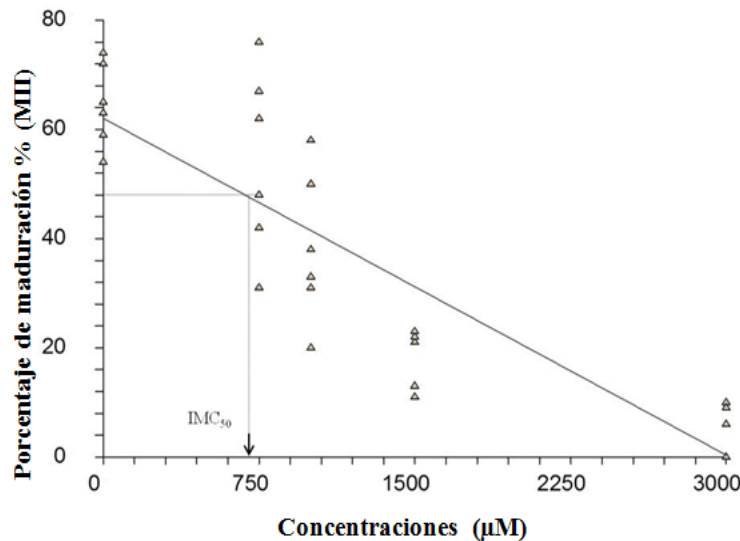
## 10. RESULTADOS

### 10.1. Efecto del malatión en la viabilidad de los COCs y la MIV de los ovocitos.

La viabilidad de los COCs y la maduración de los ovocitos se evaluaron en 540 COCs respectivamente, en tres ensayos independientes se usaron las concentraciones de 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 3000  $\mu\text{M}$  de malatión. Después de 44 h de cultivo, la viabilidad y la maduración disminuyeron a medida que la concentración del insecticida se incrementó en el medio de maduración. El coeficiente de correlación de Spearman fue significativo para la viabilidad ( $R^2 = -0.91$ ) y la maduración ( $R^2 = -0.74$ ). El valor de  $CL_{50}$  calculado fue de 1700  $\mu\text{M}$ , y de la  $CIM_{50}$  calculado fue de 750  $\mu\text{M}$  (Figura 4 y 5).



**Figura 4.** Efecto del malatión en la viabilidad de los COCs porcinos madurados con el insecticida durante 44 h de cultivo (triángulos: porcentaje de la viabilidad; línea continua: correlación negativa). Un total de 540 COCs fueron analizados en tres ensayos independientes, con las concentraciones: 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 200 y 3000  $\mu\text{M}$ . La correlación de Spearman indicó que hubo una correlación negativa significativa ( $r = -0.91$ ,  $P < 0.05$ ), entre la concentración del insecticida durante las 44 h de cultivo. De acuerdo con la regresión lineal, la  $CL_{50}$  correspondió a 1700  $\mu\text{M}$ .



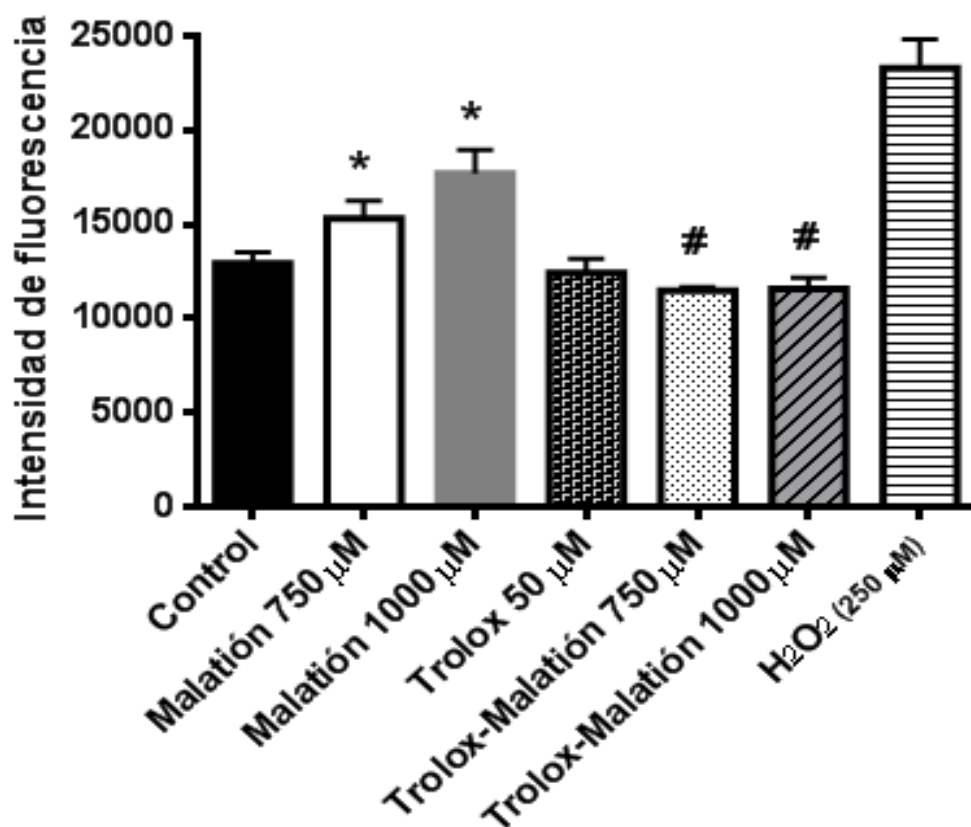
**Figura 5.** Efecto del malatión en la maduración de los ovocitos porcinos, expuestos durante 44 h de cultivo (triángulos: porcentaje de la viabilidad; línea continua: correlación negativa). Un total de 540 ovocitos fueron analizados en tres ensayos independientes con las concentraciones: 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 3000  $\mu\text{M}$ . La correlación de Spearman indicó que hubo una correlación negativa significativa ( $r = -0.74$ ,  $P < 0.05$ ), entre las concentraciones del insecticida y la maduración. De acuerdo con la regresión lineal, la  $\text{CIM}_{50}$  correspondió a 750  $\mu\text{M}$ .

### ***10.2. Efecto del malatión sobre la producción de EROS en los COCs porcinos.***

Se evaluó un total de 630 COCs en tres ensayos independientes realizados por duplicado (45 por tratamiento). Dos concentraciones de malatión, fueron elegidas para cuantificar las EROS y todos los demás parámetros de estrés oxidante: la  $\text{CIM}_{50}$  (750  $\mu\text{M}$ ) y una concentración subletal de (1000  $\mu\text{M}$ ).

Cuando los COCs fueron expuestos a las concentraciones de 750 y 1000  $\mu\text{M}$  de malatión, las EROS incrementaron significativamente, 18 y 37% respectivamente, en comparación con el grupo control (0  $\mu\text{M}$ ) (\* $P < 0.05$ ).

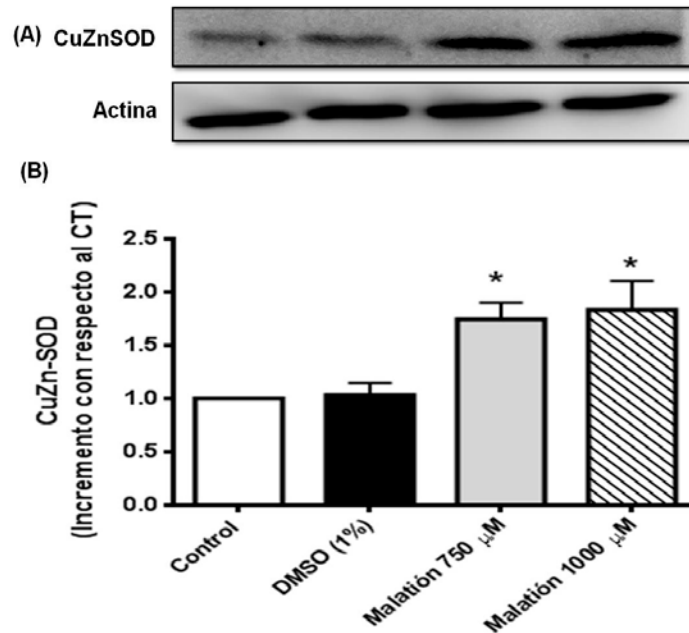
En los COCs expuestos a 750 y 1000  $\mu\text{M}$  de malatión en combinación con el antioxidante trolox (50  $\mu\text{M}$ ), los niveles de EROS disminuyeron significativamente (12 y 11%, respectivamente;  $*P < 0.05$ ) en comparación con las dos concentraciones de malatión. Todos los tratamientos de trolox mostraron niveles similares de EROS con respecto al grupo control (Fig. 6).



**Figura 6.** Efecto del malatión sobre la producción de EROS en los COCs porcinos, después de 44 h de cultivo y su efecto en los COCs pre-tratados con trolox (50  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min antes de la exposición al malatión y durante el proceso de MIV. Las EROS se evaluaron por intensidad de fluorescencia (DCFH-DA). Un total de 630 COCs fueron evaluados en tres ensayos independientes con un duplicado (45 por tratamiento). Se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250  $\mu\text{M}$ ) como control positivo de las EROS. Los valores representan la media $\pm$ DE. ( $*P < 0.05$ ) en relación al grupo control y ( $\#P < 0.05$ ) en relación al malatión.

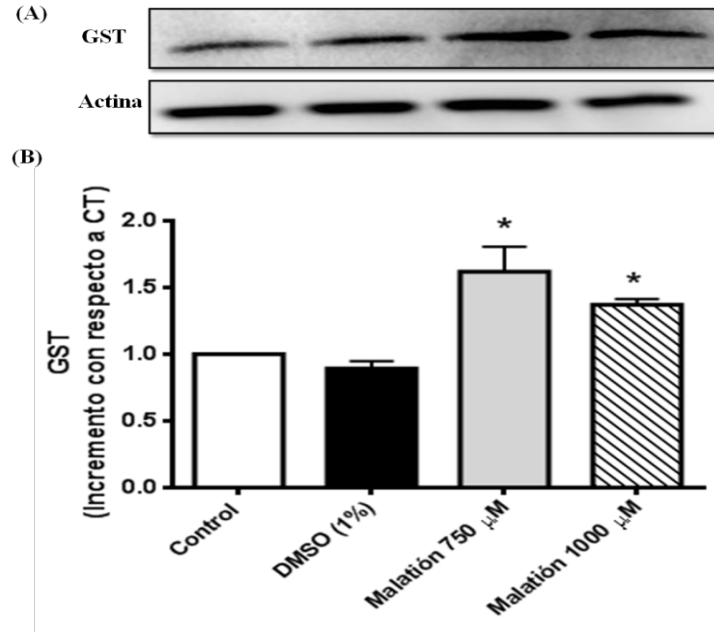
### 10.3. Efecto de malatión en la expresión de las enzimas antioxidantes.

Para cada una de las cinco enzimas analizadas, se evaluaron 100 COCs en al menos tres ensayos independientes. Cuando los COCs fueron expuestos a 750 y 1000  $\mu\text{M}$  de malatión, se mostró un aumento significativo en el contenido de las enzimas CuZn-SOD (0.74 y 0.83 veces, respectivamente), la glutatión-S-transferasa (0.61 y 0.40 veces, respectivamente) y la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (1.51 y 3.4 veces, respectivamente) con respecto al grupo control (\* $P < 0,05$ ) (Figs. 7, 8 y 9, respectivamente).

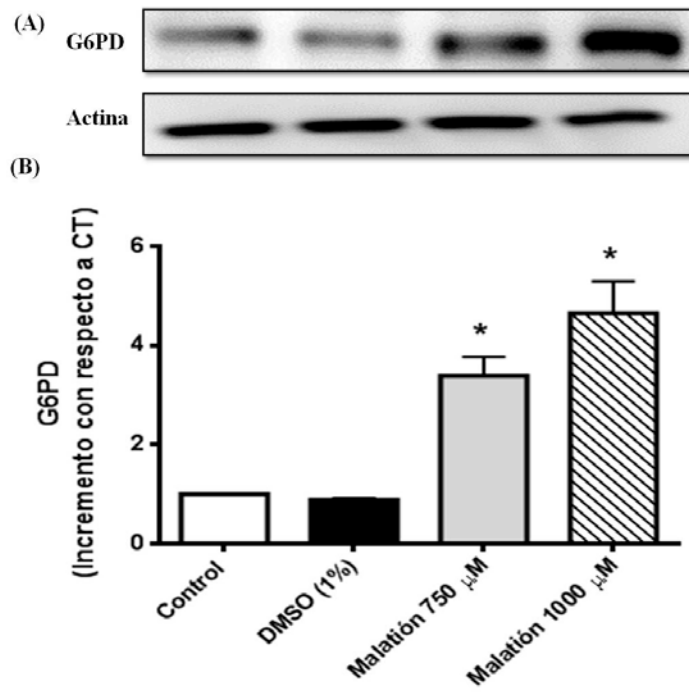


**Figura 7.** Efecto del malatión en el contenido de la enzima CuZn-SOD en los COCs, después de 44 h de cultivo. Se realizó el análisis por Western-Blot). Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto a la actina. Se evaluaron un total de 1200 COCs en tres ensayos independientes (100 por tratamiento). Los valores representan la media $\pm$ DE. \*Diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ ).



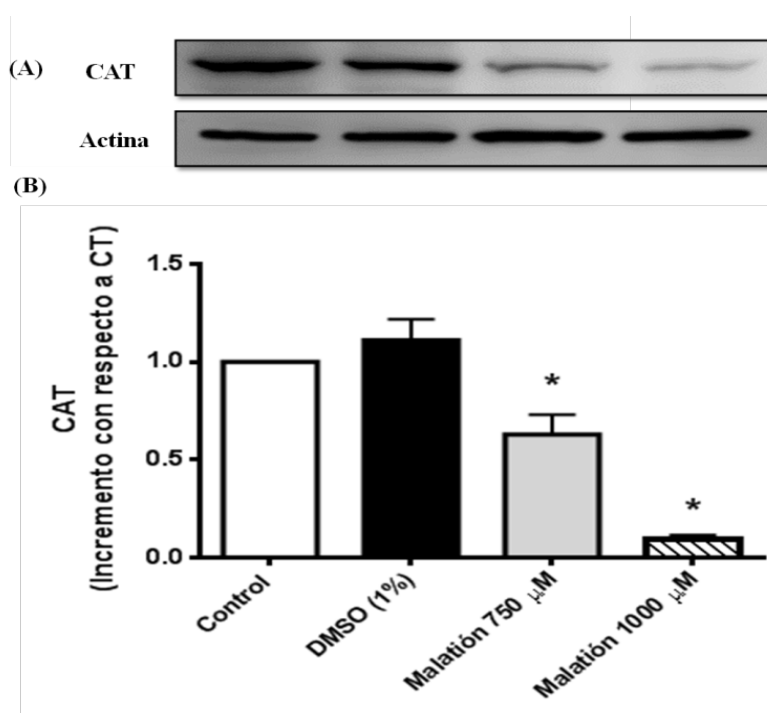


**Figura 8.** Efecto del malatión en el contenido de la enzima GST en los COCs, después de 44 h de cultivo. Se realizó el análisis por Western-Blot). Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto a la actina. Se evaluaron un total de 1200 COCs en tres ensayos independientes (100 por tratamiento). Los valores representan la media $\pm$ DE. \*Diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ ).

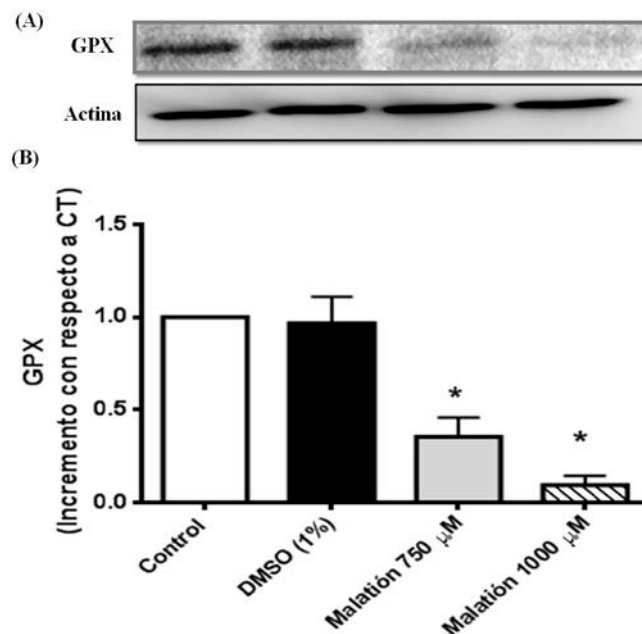


**Figura 9.** Efecto del malatión en el contenido de la enzima G6PD en los COCs, después de 44 h de cultivo. Se realizó el análisis por Western-Blot (se cargaron 20 µg de cada muestra de proteína). Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto a la actina. Se evaluaron un total de 1200 COCs en tres ensayos independientes (100 por tratamiento). Los valores representan la media±DE. \*Diferencia significativa con respecto al control (P <0.05).

Se observó que en los COCs expuestos a 750 y 1000 µM de malatión hubo una disminución significativa en el contenido de la enzima catalasa (0.33 y 0.90 veces, respectivamente) y de la enzima glutatión peroxidasa (0.65 y 0.90 veces, respectivamente) (\*P <0,05) (Fig. 10 y 11, respectivamente).



**Figura 10.** Efecto del malatión en el contenido de la enzima CAT en los COCs después de 44 h de cultivo. Se realizó el análisis por Western-Blot. Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto a la actina. Se evaluaron un total de 1200 COCs en tres ensayos independientes (100 por tratamiento). Los valores representan la media±DE. \*Diferencia significativa con respecto al control (P <0.05).

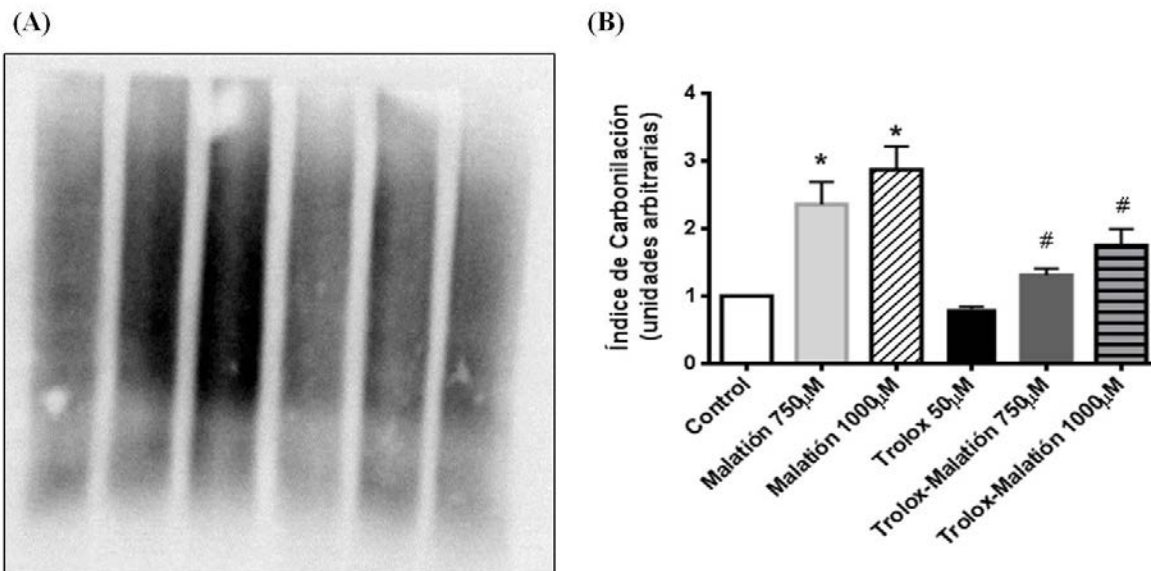


**Figura 11. Efecto** del malati3n en el contenido de la enzima GPX en los COCs, despu3s de 44 h de cultivo. Se realiz3 el an3lisis por Western-Blot. Las bandas se cuantificaron por densitometr3a y se normalizaron con respecto a la actina. Se evaluaron un total de 1200 COCs en tres ensayos independientes (100 por tratamiento). Los valores representan la media $\pm$ SD. \*Diferencia significativa con respecto al control (P <0.05).

#### ***10.4. Efecto del malati3n en la oxidaci3n de prote3nas***

Un total de 1800 COCs fueron evaluados en tres ensayos independientes (100 por cada tratamiento).

Se mostr3 un aumento significativo en el contenido de los grupos carbonilo en los COCs expuestos a 750 y 1000 µM de malati3n en comparaci3n con el grupo control, lo que indica que el insecticida produjo oxidaci3n de prote3nas en los COCs. La oxidaci3n de las prote3nas se previno cuando se a3adi3 trolox (50 µM) al cultivo antes de la exposici3n al malati3n (Fig. 12).



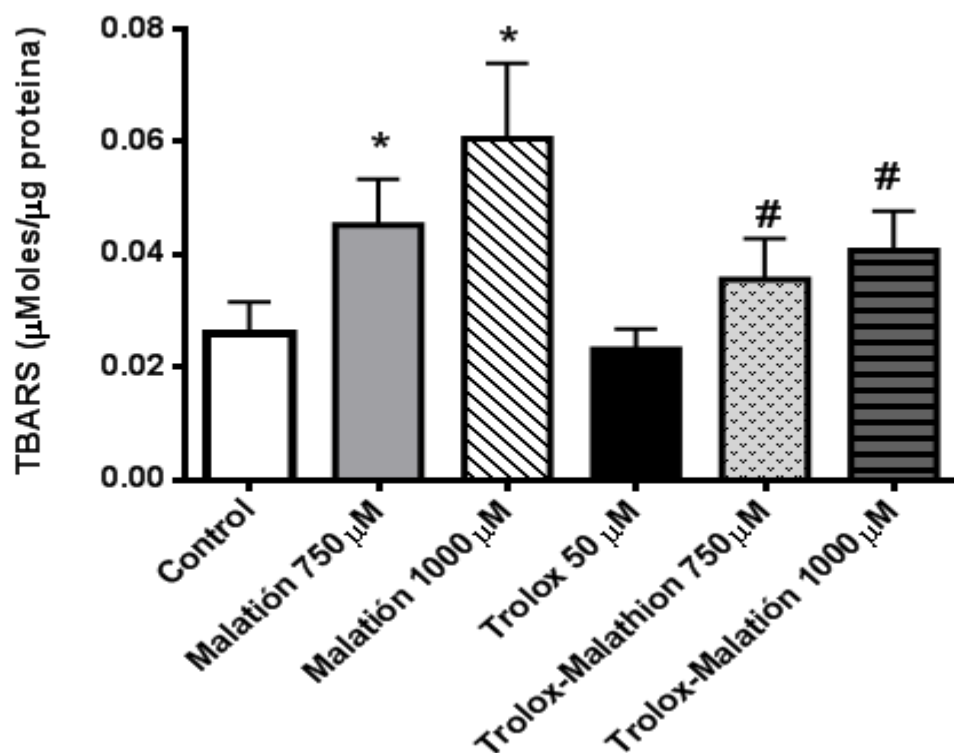
**Figura 12.** Efecto del malatión en los niveles de oxidación de las proteínas en los COCs después de 44 h de cultivo y su efecto en los COCs pre-tratados con trolox (50 µM) durante 30 min antes de la exposición al malatión. Se evaluaron un total de 1800 COCs, en tres ensayos independientes (100 por tratamiento). Los valores representan la media±DE de 3 ensayos independientes. (\*P <0.05) en relación con el grupo control y (#P <0.05) en relación con el grupo de malatión correspondiente.

### ***10.5. Efecto de malatión en los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico***

Un total de 1800 COCs fueron evaluados en tres ensayos independientes (100 por tratamiento).

En comparación con el grupo control, los COCs expuestos a 750 y 1000 µM de malatión mostraron un aumento significativo en los niveles de TBARS (0.025 y 0.040 µmol/µg de proteína, respectivamente).

El pre-tratamiento con el trolox previno significativamente la concentración de los niveles de TBARS a 0.01 y 0.02 µmol/µg en comparación con los COCs expuestos a 750 y 1000 µM de malatión, respectivamente (#P<0.05), lo que sugiere que el efecto del malatión puede ser prevenido por un antioxidante como el trolox (Fig. 13).

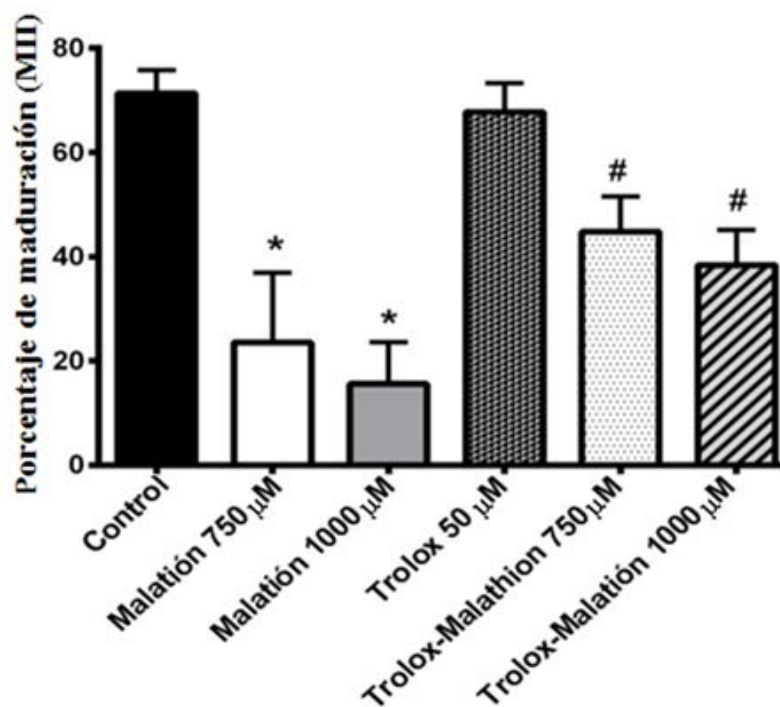


**Figura 13.** Efecto del malatión sobre los niveles de TBARS en los COCs, después de 44 h de cultivo y su efecto en los COC pre-tratados con trolox (50 μM) durante 30 min antes de la exposición con malatión. Se determinó el contenido de TBARS. Se evaluaron un total de 1800 COCs en tres ensayos independientes (100 por tratamiento). Los valores representan la media±DE de 3 ensayos independientes. (\*P <0.05) en relación con el grupo control y (#P <0.05) en relación con el grupo de malatión correspondiente.

### ***10.6. Efecto de malatión en las fases meióticas de los ovocitos***

Un total de 1500 ovocitos fueron analizados en cinco ensayos independientes. El malatión afectó la maduración de los ovocitos. Las concentraciones de 750 y 1000 μM de malatión aumentaron los porcentajes de ovocitos inmaduros (VG) (54 y 66%, respectivamente) con respecto al grupo control (11%) (\*P<0.05). El porcentaje de ovocitos maduros (MII) disminuyeron a medida que se incrementó la concentración del insecticida (25 y 17%) en comparación con el grupo control (72%) (\*P <0.05).

Cuando los ovocitos fueron pre-tratados solamente con trolox (50  $\mu$ M), el porcentaje de éstos en VG fue similar al grupo control (12 vs 11%). Cuando se añadió malatión 750 y 1000  $\mu$ M a los ovocitos pre tratados con trolox el porcentaje en la etapa de VG disminuyó significativamente (21 y 28%, respectivamente) con respecto a los ovocitos tratados únicamente con malatión (54 y 66% respectivamente), y por lo tanto, el porcentaje de ovocitos que llegó a la etapa MII (45 y 37%, respectivamente) se incrementó en comparación con los ovocitos expuestos solamente a malatión en ambas concentraciones (25 y 17% respectivamente;  $P < 0.05$ ) (Fig. 14 y Tabla 1). Esto puede estar relacionado por el efecto protector del antioxidante trolox que ejerció durante la MIV en los ovocitos pre-tratados con éste.



**Figura 14.** Efecto del malatión en la maduración de ovocitos después de 44 h de cultivo y su efecto en los COCs pre-tratados con trolox (50  $\mu$ M) durante 30 min antes de la exposición al malatión. Se analizaron un total de 1500 ovocitos en cinco ensayos independientes. Los ovocitos se tiñeron con Hoechst 33342 y se

evaluaron las diferentes etapas meióticas con un microscopio de epifluorescencia a 400X. Los valores representan la media±DE. (\*P<0.05) en relación con el grupo control y (#P <0.05) con el grupo de malatión correspondiente.

**Tabla 1.** Efecto del malatión durante la MIV y efecto antioxidante del trolox.

<b>Tratamiento Concentraciones (µM)</b>	<b>Total Número</b>	<b>Ovocitos en GV/Total (%)</b>	<b>Ovocitos en MI/Total (%)</b>	<b>Ovocitos en MII/ Total (%)</b>
<b>Control (0)</b>	183	21/183 (11)	32/183 (17)	130/183 (72)
<b>Malatión (750)</b>	185	99/185 (54)*	40/185 (21)	46/185 (25)*
<b>Malatión (1000)</b>	167	110/167 (66)*	28/167 (17)	29/167 (17)*
<b>Trolox (50)</b>	168	20/168 (12)	34/168 (20)	114/168 (68)
<b>Trolox-malatión (750)</b>	202	43/202 (21)#	68/202 (34)#	91/202 (45)#
<b>Trolox-malatión (1000)</b>	185	52/185 (28)#	64/185 (35)#	69/185 (37)#

El número de ovocitos en un total de cinco ensayos.

VG: vesicular germinal (ovocitos inmaduros); MI: metafase I (ovocitos en vías de maduración); MII: Metafase II (ovocitos madurados). \*Diferencia significativa con respecto al control (P<0.05). #Diferencia significativa con respecto al grupo de malatión correspondiente (P<0.05).

## 11. DISCUSIÓN

Los plaguicidas OF, son los más comúnmente utilizados en México y en el mundo para el uso agrícola y doméstico, pero hoy en día un amplio uso y exposición a estos plaguicidas ha incrementado el número de intoxicaciones provocando daños a la salud incluyendo enfermedades del corazón, trastornos hormonales, enfermedades de la piel, eventos mutagénicos y cancerígenos (Ojha y Srivastava, 2012).

Entre los principales insecticidas altamente tóxicos se encuentran los OF como es el malatión, en México se emplean grandes volúmenes de este insecticida para uso agrícola y doméstico, siendo un riesgo para la salud reproductiva. Los OF, como el malatión, inhiben la actividad de AChE a través de la unión irreversible con el sitio catalítico de la enzima, dando como resultado una acumulación de acetilcolina en la sinapsis y la sobreestimulación de receptores muscarínicos y nicotínicos (Ojha y Srivastava, 2012). Esta enzima está relacionada con la modulación de la transmisión del impulso neuromuscular.

Además, puede estar relacionado con otros procesos no neuromusculares como las interacciones celulares mediadas por eventos eléctricos y cambios en las concentraciones iónicas, que ocurren durante la interacción de los gametos y el desarrollo embrionario temprano (Aluigi et al, 2005; Ducolomb et al, 2009).

Además de ser potentes compuestos anticolinesterásicos, algunos estudios demuestran que los insecticidas OF pueden tener otros efectos sin relación directa con la inhibición de la AChE, que incluyen la generación de EOX, alterando la actividad de las enzimas antioxidantes y provocando LPO (Yarsan et al, 1999).

Varios estudios han demostrado que el malatión produce EOX, el cual ha sido reportado como un posible mecanismo para la toxicidad de este insecticida, en estudios tanto in vivo como in vitro en células somáticas de mamíferos, pero no hay estudios en los gametos que demuestren este efecto.

En un estudio previo se demostró que este insecticida afecta a la MIV de los ovocitos porcinos (Casas et al, 2010), y es importante conocer los posibles mecanismos por los cuales este insecticida organofosforado afecta este proceso.



Por tal motivo el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del EOX producido por el malatión en los COCs porcinos durante la MIV, y determinar si el trolox podría atenuar el daño oxidante.

En el presente estudio se evaluó la viabilidad de los COCs mediante dos tinciones: MTT que es una tinción colorimétrica y la tinción de cristal violeta la cual se mide por espectrofotometría, ambas tinciones dieron resultados muy semejantes y la tinción por MTT fue la que se reportó en los resultados.

La MIV fue evaluada mediante la tinción con Hoechst (bisbenzimidida). Se determinaron las concentraciones  $CL_{50}$  y la de  $CIM_{50}$  con malatión de grado reactivo, que fueron más altas (1000 y 750  $\mu M$ ) en comparación en un estudio reportado por Casas et al. (2010) (57 y 25  $\mu M$ , respectivamente). Sin embargo, se observó un efecto concentración-respuesta semejante en ambos casos, encontrándose una disminución en los porcentajes de viabilidad y maduración a medida que se incrementaron las concentraciones del insecticida en el medio de maduración. Las diferencias observadas en las concentraciones pueden ser debidas a que el malatión empleado en ese estudio, fue una presentación comercial y el efecto puede deberse a las impurezas presentes como malaoxón, isomalatión y otras relacionadas no identificadas de alto riesgo presentes en dichas formulaciones. Estas impurezas se pueden producir durante el almacenamiento a temperaturas altas, y provocando un efecto tóxico mayor, a concentraciones menores. En muchos casos, los derivados de la propia molécula de malatión son más tóxicos que el malatión puro y estas impurezas pueden actuar entre sí, aumentando o disminuyendo la toxicidad del producto comercial (Montenegro, 2001). Por estas razones, el presente estudio se realizó con malatión de grado reactivo, cuya pureza es del 99%. En otro estudio, también se empleó

malatión de grado reactivo en el cual se usaron concentraciones muy altas (6-24 mM en células HepG2) (Moore et al, 2010).

En humanos se ha detectado en la orina la presencia de varios plaguicidas, incluyendo este insecticida, se han detectado concentraciones de (530  $\mu\text{M}$ ) (Barr et al, 2005). Las concentraciones de malatión que se han encontrado en sangre de trabajadores agrícolas se ha estimado en 30  $\mu\text{M}$  (Pluth et al, 1998) y 200  $\mu\text{M}$  en eritrocitos humanos (Blasiak y Stan'kowska, 2001). Un estudio informó que concentraciones de malatión de 6 a 24 mM, provocaron efectos citotóxicos y genotóxicos en las células HepG2 (Moore et al, 2010).

En el presente estudio, se eligieron dos concentraciones de malatión, para determinar si había daño oxidante por la exposición a este insecticida: la concentración  $\text{CIM}_{50}$  (750  $\mu\text{M}$ ) y una concentración subletal de (1000  $\mu\text{M}$ ), estas dos concentraciones se utilizaron para evaluar los diferentes parámetros bioquímicos relacionados con el EOx.

El EOx se caracteriza por un desbalance entre la producción de EROS y la habilidad de los sistemas biológicos para detoxificar rápidamente intermediarios activos o para reparar el daño resultante. Las perturbaciones en el estado normal redox de los tejidos pueden provocar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo lípidos, proteínas y ADN (Ojha y Srivastava, 2012).

Los insecticidas OF, perturban la homeostasis en el estado redox, mediante la interrupción del metabolismo mitocondrial. Hay estudios que demuestran que la mitocondria es el principal organelo celular de destino de los compuestos OF que inhiben la actividad enzimática y la generación de ATP, y también causan alteraciones estructurales en la matriz mitocondrial (Carlson y Ehrich, 1999; Tos-Luty et al, 2003). Además el metabolismo mitocondrial no solo es el responsable de la generación de energía, sino también en la

formación de los radicales libres. Algunos estudios sugieren que una amplia gama de insecticidas como los OF podrían dar como resultado la producción de radicales libres y la inactivación de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Barja y Herrero, 1998; Turner et al, 2003; Delgado et al, 2006).

En el presente estudio los resultados mostraron que el EOx es causante de esta toxicidad, se observó un incremento significativo de la concentración en niveles de EROS intracelulares en los COCs expuestos con 750 y 1000  $\mu\text{M}$  de malatión después de las 44 h de cultivo. Estudios previos han mostrado que hay un incremento en la producción del anión superóxido después de la exposición a compuestos OF, debido a la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria en las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) (Massicotte et al, 2005) y en cerebro de rata (Ranjbar et al, 2010).

En otros estudios se ha mostrado que el malatión altera la expresión de genes en mórulas en donde se pudo observar una disminución en la expresión de al menos 11 genes, tanto mitocondriales como nucleares (Salazar et al, 2007). En la ovogénesis temprana se ha demostrado que el malatión altera la regulación de varios genes involucrados en la transcripción (BP75), traducción (proteína ribosomal 5S) y en la función mitocondrial (citocromo oxidasa, unidades I y III) (Bonilla et al, 2008).

Otro estudio mostro que la exposición a malatión 300  $\mu\text{M}$  durante 12 h en timocitos murinos, incrementó el anión superóxido y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y provocó una alteración en los niveles de ciertas enzimas antioxidantes (Olgun y Misra, 2006).

El EOx puede influir en la maduración de los ovocitos, afectando la fertilización y el subsecuente desarrollo embrionario. La alteración del estado redox durante el cultivo in vitro de ovocitos humanos, se asoció con un aumento en la apoptosis de los gametos (Tamura et al, 2008). En los ovocitos porcinos, las condiciones de cultivo durante la MIV

pueden inducir EOX y reducir la capacidad de la maduración nuclear y citoplásmica (Álvarez et al, 2015).

En el presente estudio, cuando los ovocitos fueron expuestos a malati3n durante la MIV, el porcentaje de ovocitos en la etapa VG se mantuvo alto en ambas concentraciones, indicando un bloqueo en la reanudaci3n de la meiosis. Estos resultados coinciden con los reportados por Tamura et al. (2008) donde el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo inhibi3 la maduraci3n de ovocitos murinos.

La maduraci3n de los ovocitos requiere del correcto ensamblaje y de la funci3n normal del huso mei3tico; varios estudios han relacionado modificaciones en el correcto ensamblaje del huso en distintas condiciones de cultivo durante la MIV (Li et al, 2006). Entre los principales da1os producidos por el EOX que se han observado se incluyen la integridad del huso, alteraciones en la dinámica de los microt3bulos y un incorrecto alineamiento de los cromosomas durante la maduraci3n de los ovocitos de rat3n (Choi et al, 2007).

Se ha sugerido que las EROS est3n involucrados en el bloqueo del desarrollo embrionario a partir de dos c3lulas en embriones de rat3n (Goto et al, 1993). Das et al. (2006) inform3 que altas concentraciones de EROS en el fluido folicular est3n correlacionadas con una mala calidad de los ovocitos y una posterior disminuci3n del desarrollo embrionario.

Los organismos vivos poseen mecanismos de defensa antioxidante para contrarrestar los efectos negativos de las EROS. La primera enzima de defensa antioxidante es la SOD, la cual elimina el an3n super3xido a trav3s de una reacci3n de conversi3n en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. A su vez, las per3xidasas como CAT y GSH-Px transforman el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>, eliminando de este modo, las EROS (Cao et al, 2003). Los OF pueden tener efectos que incluyen la generaci3n de EROS y la alteraci3n del funcionamiento de las enzimas antioxidantes (Yarsan et al, 1999).

En el presente estudio se determinó el contenido de las enzimas antioxidantes mediante la técnica de Western-Blot y se observó que el malati3n alter3 el contenido de las cinco enzimas antioxidantes evaluadas en los COCs porcinos expuestos a este insecticida, durante la MIV. El contenido de la enzima CuZn-SOD increment3 significativamente, esto podr3 deberse a un mecanismo de compensaci3n en respuesta al aumento de la producci3n de EROS, para poder compensar los da3os causados por ellos, pero esto no significa que la actividad catal3tica sea funcional. En un estudio previo se evalu3 la actividad catal3tica de esta enzima en timocitos murinos incubados con malati3n durante 12 h, y se observ3 que la actividad de la SOD increment3 significativamente (Olgun y Misra, 2006). El mismo efecto se observ3 en eritrocitos y en h3gado de rata (Akhgari et al, 2003) pero no hay estudios que evalúen el contenido de esta enzima.

Otras enzimas per3xidasas como la CAT y GSH-Px, protegen a las c3lulas y tejidos del da3o oxidante. En este estudio, el contenido de las enzimas; CAT y de GSH-Px se redujo significativamente cuando los COCs se expusieron a ambas concentraciones de malati3n.

En la literatura no hay estudios que evalúen el contenido de las enzimas antioxidantes en presencia de malati3n, pero si hay estudios en los que se evalúa la actividad catal3tica de las enzimas y existe una evidencia contradictoria en los resultados que sugiere que la actividad aumenta, disminuye, o no ocurren cambios en diferentes tejidos de h3gado, cerebro y en eritrocitos de rat3n tratados con malati3n (John et al, 2001; Hazarika et al, 2003). Estas diferencias pueden deberse al tiempo o a la v3a de exposici3n del insecticida (Brocardo et al, 2005).

Estudios previos, han mostrado que la actividad de las enzimas CAT y GSH-Px est3n reguladas por mecanismos post-traduccionales, tales como la fosforilaci3n en residuos de tirosina espec3ficos. Se ha demostrado que la actividad de la enzima CAT est3 regulada por

la fosforilación en los residuos Tyr231 y Tyr385, y la enzima GSH-Px está regulada por la fosforilación en el residuo Tyr96 (Sadi et al, 2014).

Otro mecanismo potencial para la reducción de la actividad de las enzimas, puede ser debido a su inactivación por el exceso de EROS, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se ha demostrado que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno o la producción intracelular, en respuesta a la estimulación del receptor, puede afectar la función de varias proteínas, incluyendo las proteínas cinasas, proteínas fosfatasas, factores de transcripción, fosfolipasas, canales de iones y proteínas G (Rhee, 2003).

En el presente estudio, una disminución en el contenido de GSH-Px fue acompañada por un aumento en la cantidad de la enzima GST probablemente como una medida adaptativa para hacer frente a la acumulación de los insecticidas, la familia de las enzimas glutatión transferasas, comprende a una familia de enzimas multifuncionales que catalizan la conjugación del GSH de una gran variedad de compuestos alquilantes electrofílicos, algunos de los cuales son productos del daño oxidante en las membranas biológicas y las biomoléculas (Carbone et al, 2003).

Los niveles elevados de GST podrían contribuir a una eficaz detoxificación de los compuestos tóxicos. Aunque en el presente estudio no se evaluó la actividad de esta enzima, se sabe que algunos insecticidas organoclorados y OF, consumen GSH a través de una reacción catalizada por GST y aumentan la síntesis de esta enzima como un mecanismo de adaptación para contrarrestar los efectos del EOx, como una vía de detoxificación de estos compuestos químicos (Khrer, 1993). Los resultados del presente estudio indican que las enzimas vinculadas a las vías de glutatión (GST y GSH-Px) que participan en el sistema de defensa antioxidante, se vieron afectadas en los COCs porcinos expuestos a malatión, durante la MIV.

Otra enzima evaluada en este estudio, fue la G6PD, la cual se incrementó significativamente en los COCs expuestos al insecticida. En otro estudio previo, evaluaron la actividad de esta enzima en diversos tejidos de rata y se observó que la actividad de esta enzima se incrementó después de la exposición a compuestos OF (Ojha y Srivastava, 2012).

La primera reacción de la vía de las pentosas fosfato es catalizada por la enzima G6PD y es el sitio principal de producción de NADPH, que es la donante fundamental de electrones para un número importante de reacciones enzimáticas proporcionando los agentes reductores para las reacciones de oxido-reducción implicadas en la protección contra la toxicidad de las EROS como el  $H_2O_2$ . Algunas de estas reacciones, por ejemplo, la catalizada por la enzima GR, y poder mantener los niveles de GSH en la célula, es esencial en la protección de la célula contra el EOx.

Una alteración en la actividad de esta enzima puede afectar a la generación del NADPH y provocar una alteración del estado redox celular, el cual es un indicador importante de EOx (Acosta et al, 2012; Ojha y Srivastava, 2012).

Las alteraciones en el estado redox pueden provocar efectos daño a través de la producción de peróxidos y de radicales libres que dañan todos los componentes celulares, incluyendo los lípidos, proteínas y el ADN. En este estudio, se determinó el daño oxidante a las proteínas por la presencia de los grupos carbonilo, los cuales se incrementaron significativamente en los COCs expuestos a malatión durante 44 h de cultivo.

El daño oxidante a las proteínas se caracteriza por la modificación estructural de las cadenas laterales por acción de las EROS que atacan directamente en las cadenas laterales a los aminoácidos como prolina, arginina, lisina y treonina y dan lugar a la formación de los grupos carbonilo, que eventualmente cambian la estructura terciaria de las proteínas, dando

como resultado alteraciones en su función (Lim y Luderer, 2011). En estudios previos se observó un aumento significativo en la presencia de grupos carbonilo en cerebro de rata (Brocardo et al, 2005; Fortunato et al, 2006), en pulmón y riñón (Possamai et al, 2007), cuando estos tejidos fueron expuestos a malatión.

Por otra parte, el malatión es un insecticida de tipo lipofílico; esta característica facilita su interacción con la membrana celular y puede provocar una alteración en la estructura de la bicapa de los fosfolípidos (Possamai et al, 2007).

Los lípidos son otras biomoléculas altamente susceptibles al daño por las EROS, y la peroxidación lipídica se ha sugerido como uno de los mecanismos implicados en la toxicidad de los plaguicidas (Khrer, 1993). El daño en los fosfolípidos de membrana disminuye su fluidez, provocando cambios estructurales y la disminución en la actividad de las enzimas en la membrana, lo que afecta a las diferentes vías de señalización celulares. Las TBARS se forman como un subproducto de la peroxidación de los lípidos, como uno de los principales productos de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y el incremento de éstas es un importante indicador de LPO.

En este estudio, se determinaron los niveles de TBARS, mismos que se incrementaron significativamente en los COCs expuestos a malatión, lo que sugiere que este insecticida produjo LPO, y esto concuerda con estudios previos en los que se mostró que el malatión aumentó los niveles de TBARS en algunos tejidos (Hazarika et al, 2003), cerebro (Fortunato et al, 2006; Delgado et al, 2006; Brocardo et al, 2005, Ranjbar et al, 2010), linfocitos y eritrocitos (Muñiz et al, 2008), en timocitos (Olgun y Misra, 2006) y en la línea celular de carcinoma de hígado HepG<sub>2</sub> (Moore et al, 2010).

La célula posee mecanismos de defensa para contrarrestar el daño inducido por los radicales libres. Los antioxidantes son moléculas que cuando están presentes a bajas



concentraciones en comparación con los sustratos oxidables, previenen o retardan la oxidación de las biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN.

Los antioxidantes no enzimáticos, como las vitaminas C y E, son aquellos compuestos que donan sus electrones a los radicales libres, neutralizándolos y evitando reacciones en cadena (Agarwal et al, 2005). Es posible que la vitamina E en la membrana celular, pueda impedir el daño oxidante producido por los compuestos OF (John et al, 2001). El antioxidante trolox aparece como un candidato prometedor para atenuar el daño oxidante causado por las EROS; es un análogo de la vitamina E que podría reducir la oxidación de los lípidos de la membrana celular, como un agente estabilizador.

Se ha demostrado que protege a las células del daño oxidante en estudios tanto in vivo como in vitro (Saikhun et al, 2008). La actividad antioxidante de la vitamina E, está dirigida principalmente hacia el componente lipídico de la membrana celular ya que puede reaccionar con radicales peroxilo y formar un nuevo radical mucho más estable (Kalender et al, 2007). Se ha demostrado que inhibe la formación de radicales libres y es eficaz en la reducción de la peroxidación lipídica en diferentes sistemas biológicos (Durak et al, 2009).

En este estudio se evaluó el efecto antioxidante del trolox en los COCs porcinos expuestos a malatión durante la MIV. Los resultados mostraron que los COCs pre-tratados con trolox (50  $\mu$ M), por 30 min antes y durante el proceso de MIV (44 h) disminuyeron significativamente las EROS, la oxidación de proteínas, los niveles de TBARS, y aumentó el porcentaje de maduración de los ovocitos (MII), en comparación con los COCs expuestos sólo al insecticida.

Sin embargo, concentraciones crecientes de vitamina E son tóxicas para los embriones de bovinos, así como en embriones de ratón (Wang et al, 2002). En el presente estudio se eligió la concentración de trolox 50  $\mu$ M porque tuvo un efecto protector en comparación

con la concentración de 100  $\mu\text{M}$  que presento un efecto tóxico (datos no mostrados). Takami et al. (1999) mostraron que la maduración de ovocitos de rata no incrementó con trolox 100  $\mu\text{M}$ .

Estudios previos han mostrado que una mezcla de alfa-tocoferol 20  $\mu\text{M}$  y de ácido ascórbico 750  $\mu\text{M}$  tuvieron un efecto benéfico en la maduración citoplasmática en ovocitos de oveja (Miclea et al, 2012).

Wongsrikeao et al. (2007) reportaron que la suplementación con vitamina E durante la MIV de ovocitos incrementó el porcentaje de blastocistos, disminuyó el número de blastómeros apoptóticos y el daño al ADN, en los blastocistos bovinos.

En otro estudio un pre-tratamiento con vitamina E (600  $\mu\text{M}$ ) disminuyó la citotoxicidad y genotoxicidad en células PC12 expuestas a los OF (Xiant et al, 2012).

En sistemas de producción de embriones, el alfa-tocoferol (vitamina E) tiene efectos benéficos para proteger a los embriones en contra de las EROS que pueden ser producidas por una alta concentración de  $\text{O}_2$  (Peng et al, 2008).

El trolox se ha utilizado con éxito para mejorar el desarrollo in vitro de embriones bovinos (Olson y Seidel, 2000).

En otro estudio aumentó la calidad de los embriones de búfalo, incrementó la tasa de blastocistos y el número de células del blastocisto (Saikhun et al, 2008). El trolox añadido al medio de cultivo disminuyó el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y aumentó la capacidad del desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto y el número de blastómeros en embriones porcinos producidos por fertilización in vitro (Kitawaga et al, 2004). Por otra parte, Feugang et al (2004) informaron que la vitamina E podría proteger a las mórulas y blastocistos bovinos expuestos a  $\text{EOx}$  generado a través de un aumento de la producción de EROS o una disminución en la protección antioxidante.

El alfa-tocoferol es el antioxidante más importante presente en el ovario y el fluido folicular, y su deficiencia podría afectar a la supervivencia de embriones (Agarwal et al, 2012).

En el presente estudio el modelo empleado fueron los COCs porcinos, para imitar la maduración in vivo natural de los ovocitos y determinar cómo este proceso se ve afectado por el malatión. Las células del cumulus desempeñan un papel muy importante en la maduración nuclear de los ovocitos para apoyar el progreso hasta la etapa de metafase II. La maduración citoplasmática también es necesaria para la capacidad del desarrollo embrionario, protegiendo también a los ovocitos contra el daño celular producido por el EOx, durante la MIV (Tatemoto et al, 2000; Abeydeera, 2002; Combelles et al, 2009).

La reproducción es un proceso complejo que comprende la gametogénesis, la fertilización y el desarrollo embrionario y fetal. Cada evento es muy importante ya que alguna alteración en cualquiera de ellos, puede afectar seriamente las etapas posteriores. Estos resultados son importantes en relación con el proceso reproductivo normal, ya que es bien sabido que la maduración de los ovocitos es un evento crucial para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. El EOx puede causar una alteración durante la maduración de los ovocitos, lo que podría ser perjudicial en los eventos reproductivos posteriores.

## 12. CONCLUSIONES

- a) En el presente estudio se demostró que el malatión produjo EOX en los COCs porcinos expuestos a malatión durante la MIV.
- b) El malatión incrementó los niveles de EROS, oxidación de proteínas y de TBARS.
- c) Provocó alteraciones en el contenido de las enzimas antioxidantes: CuZn-SOD, CAT, GSH-Px, GST y la G6PDH durante la MIV.
- d) La toxicidad del malatión fue atenuada por efecto del antioxidante trolox, disminuyendo el EOX, e incrementando los porcentajes de maduración en los ovocitos porcinos.
- e) Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de estudiar los efectos de los contaminantes ambientales sobre la maduración de los ovocitos, como una posible causa de las alteraciones en la salud reproductiva, ya que la maduración de los ovocitos es un pre-requisito fundamental para que eventos posteriores, como la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, se produzcan de manera normal.
- f) El conocimiento de los mecanismos de acción de estos compuestos xenobióticos es una herramienta poderosa, ya que nos permite conocer las alteraciones que estos compuestos xenobióticos puedan causar tanto a nivel molecular, celular, bioquímico y fisiológico, ya que pueden interferir con las funciones reproductivas y puede ser útil para prevenir los efectos indeseados de tales compuestos, como el EOX que puede provocar aneuploidías y abortos espontáneos, hasta la creación de otros métodos de control de plagas más compatibles con los humanos, animales y el medio ambiente.

### 13. REFERENCIAS

Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 10: 141-147.

Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. (1998). Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol Reprod.* 58: 1316-1320.

Abeydeera LR. 2002. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology.* 1:256-273.

Acosta I, Milani AC, Perez SM, Lanza O, Detarsio G. (2012). Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Rosario. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 46: 359-63.

Agarwal A, Aponte M., Premkumar B, Shaman A, Gupta S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 10: 1-31.

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 3: 1-28.

Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD. (2000). Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales rose*) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol.* 38: 443-450.

Aitken J, Beker. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Moland Cell Endocrinol.* 250: 66-69.

Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. (2003). Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol.* 4: 205-211.

Albert L. (2004). Contaminantes ambientales y criterios de evaluación. En: Albert L. (2004). Toxicología Ambiental. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. pp 147-164.

Aluigi MG, Angelini C, Falugi C, Fossa R, Genever P, Gallus L, Layer PG, Prestipino G, Rakonczay Z, Sgro M, Thielecke H, Trombino S. (2005). Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. *Chem Biol Interact.* 157-158:305-16.

Alvarez GM, Dalvit GC, Achi MV, Miguez MS, Cetica PD. (2009). Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell.* 33:167-177.

Alvarez GM, Morado SA, Soto MP, Dalvit GC, Cetica PD. 2015. The Control of Reactive Oxygen Species Influences Porcine Oocyte In Vitro Maturation. *Reprod Dom Anim.* 50:200–205.

Ambrosi B, Lacalandra A, Iorga T, De Santis S, Mugnier R, Matarrese G, Goudet, Dell'Aquila E. (2009). Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology.* 71:1093-1104.

Andersen M, Ragueira T, Brohn A, Perez P, Strubel P. (2008). Lipidperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock. Hindawi Publishing Corporation, *Mediators of Inflammation.* 10: 1-8.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological Profile for Malathion; U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic substances and disease registry: Atlanta, (2008).

- Austin CR. (1982). Fertilización. En: R. AC, Short RV (eds), Células germinales y fertilización. México, D.F.: La Prensa Médica Mexicana, S.A. de C.V, 107-138.
- Baker TG. (1982). Oogénesis y ovulación. En: R. AC, Short RV (eds), Células germinales y ovulación. México, D.F.: La Prensa Médica Mexicana, S.A. de C.V., 15-47.
- Barja G, Herrero A. (1998). Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsympatic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bionerg Biomembr.* 30: 235-243.
- Barr DB, Allen R, Olsson AO, Bravo R, Caltabiano LM, Montesano A. (2005). Concentrations of selective metabolites of organophosphorus pesticides in the United State population. *Environ Res.* 3:314-316.
- Bearden HJ, Fuquay JW. (1982). Reproducción animal aplicada. México, D.F.: El Manual Moderno, S.A. de C.V., 73-81.
- Berger T, Horner MC. (2003). In vivo exposure of female rats to toxicants may affect oocyte quality. *Reprod Toxicol.* 17:273-281.
- Betancourt M, Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y. (2003). Maduración de gamentos y fertilización. En: Jiménez LF, Merchant H (eds), *Biología Celular y Molecular*. México: Prentice Hall, 679-711.
- Betancourt M, Reséndiz A, Casas E, Fierro R. (2006). Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reprod Toxicol.* 22: 508–512.
- Bhardwaj K, Saraf P. (2014). Malathion-Induced Granulosa Cell Apoptosis in Caprine Antral Follicles: An Ultrastructural and Flow Cytometric Analysis. *Microsc Microanal.* 20: 1861-1868.

- Bielanska-Osuchowska. (2006). Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproduc Biol.* 6:161-193.
- Blasiak J, Jalszynski P, Trzeciak A., Szyfter, K. (1999). In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mut. Res.* 445: 275-283.
- Blasiak J, Stan'kowska D. (2001). Genotoxicity of malaoxon: Induction of oxidized and methylated bases and protective effect of alpha-Tocopherol. *Pestic Biochem Phys.* 71:88–96.
- Bonilla E, Hernández F, Cortés L, Mendoza M, Mejía J, Carrillo E, Casas E, Betancourt M. (2008). Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early oogenesis in mice in vitro. *Environ Toxicol.* 23:240-245.
- Bossan D, Wortham H, Masclat P. (1995). Atmospheric transport of pesticides absorbed on aerosols I. Photo degradation in simulated atmosphere. *Chemosphere.* 1:21–29.
- Brocardo P, Pandolfo P, Takahashi R, Rodrigues AL, Dafre A. (2005). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology.* 207: 283-291.
- Brusick D. (1987). *Principles of Genetic Toxicology*, 2nd ed. Plenum Press, New York.
- Campagna C, Guillemette C, Sirard MA, Ayotte P, Bailey JL. (2002). An environmentally relevant organochlorine mixture impairs sperm function and embryo development in the porcine model. *Biol Reprod.* 67:80-87.
- Campagna C, Sirard M, Ayotte P, Bailey JL. (2001). Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. *Biol Reprod.* 65:554–560.



- Cantor KP, Blair A, Brown LM, Burmeister LF, Everett G. (1992). Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* 52:2447–55.
- Cao C, Leng Y, Huang W. (2003). Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 278: 39609–39614.
- Carbone M.C, Tatone C, Delle S, Monache, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. (2003). Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod.* 9: 639-643.
- Carlson K, Ehrich M. (1999). Organophosphorus compound induced modification of SH-SY5Y human neuroblastoma mitochondrial transmembrane potential. *Toxicol Appl Pharmacol.* 160: 33-42.
- Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicol in Vitro.* 24:224-230.
- Cavieres MF. (2004). Pesticides exposure and reproductive and birth defect. *Critical analysis of epidemiological and experimental evidence.* *Rev Med Chile.* 132:873-879.
- Choi WJ, Banerjee J, Falcone T. (2007). Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertil Steril.* 88:1220–1231.
- CICOPLAFEST (2002). Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas. México.
- Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. (2009). Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes?. *Reprod Biomed Online.* 18:864-880.

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

Costa LG. Toxic effects of pesticides. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edn; Klaassen CD (ed.) McGraw Hill Medical: New York. 2008. pp.883–930.

Dang-Nguyen TQ, Somfai T, Haraguchi S, Kikuchi K, Tajima A, Kanai Y, Nagai T. (2011). In vitro production of porcine embryos current status, future perspectives and alternative applications. *Anim Sci J.* 82: 374-387.

Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF?.(2006). *Hum Reprod.* 21: 2403–2407.

Datta C, Gupta J, Sengupta D. (1994). Interaction of organophosphorus insecticides phosphamidon & malathion on lipid profile & acetylcholinesterase activity in human erythrocyte membrane. *Indian J Med Res.* 100:87-89.

Dean JH, Murray MJ. Toxic responses of the immune system. In: Mary OA, Doull J, Klaassen C. (eds.) Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons, Fourth Edition. Pergamon Press, NY. (1991).

Delgado E, Streck E, Quevedo J, Dal-Pizzol F. (2006). Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. *Neurochem Res.* 31:1021-1025.

Draper HH, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186:421–431.

Ducolomb Y, Casas E, Valdez A, Gonzalez G, Altamirano-Lozano M, Betancourt M. (2009). In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol Toxicol.* 25: 623-633.

Dunbar BS, Wardrip NJ, Hedrick JL. (1980). Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochem. 2*: 356-365.

Durak D, Uzun F, Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender F. (2009). Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E *in vitro*. *Environ Toxicol. 24*: 235-242.

Dyro FM. Organophosphate. eMedicine. Updated 13 March 2003. Available from: <http://www.emedicine.com/neuro/topic286.htm> [accessed: 7 July 2016].

Edwards D. (2006). Reregistration Eligibility Decision for Malathion. US Environmental Protection Agency Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA 738-R-06-030 journal 9.

Eichenlaub-Ritte U, Wieczorek M, Luke S, Seidel T. (2010). Age related changes in mitochondrial function a new approach to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion. 548*:101-114.

Elejalde G. (2011). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anal Med Inter. 18*: 326-335.

EPA, Environmental Protection Agency. (2006). Malathion; notice of pesticide tolerance revocations; final rule. US-Department of Health and Human Services.

Epigg, J. (1991). Intercommunication between mammalian oocyte and companion somatic cells. *Bioessay. 13*: 569-574.

Fan, H, Sun. Q. Y. (2004). Involvement of mitogen activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod. 70*: 535-547.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology. 71*:836-848.

Feugang JM, Rudolf De Roover, Andre´ Moens, Serge Le´onarda, Franz Dessy, Isabelle Donnay. (2004). Addition of b-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*. 61: 71–90.

Fortunato JJ, Feier G, Vitali AM, Petronilo F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. (2006). Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochem Res*. 31:671–678.

Fujii J, Iuchi Y, Okada F. (2005). Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*. 3: 43-53.

Genestra M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascade and antioxidants. *Cell Signal*. 19: 1807-1819.

Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. (2010). Advances in swine in vitro embryo production technologies. *Reprod Domest Anim*. 2:40-48.

Gomez-Quiroz, LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. (2008). Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 283:14581–14589.

Goto K, Noda Y, Mori T. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radical Biol. Med*. 15:69-75.

Hafez E. Hafez B. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Ed. McGraw-Hill interamericana. México. pp. 70-82.

Hafez ESE, Hafez B. (2000). Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Hafez ESE, Halliwell B. (1999). Antioxidant defense mechanisms from the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad Res*. 4: 261-272.

Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik JK. (2003). Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilufos in male rats: a biochemic inter-action study. *Toxicology*. 185: 1-8.

Hicks JJ, Torres RY, Sierra VM. (2006). Estrés oxidante. Concepto y Clasificación. *Rev Endocrinol Nutr*. 14: 223-226.

Hood R. (2012). *Developmental and Reproductive Toxicology. A Practical Approach*. Tercera edición. Ed Informa healthcare. New York. pp. 10-13.

Houdebine LM, Rival S, Pantano T, Jolivet G, Thepot D, Attal J. (2002). Transgénesis for the study and the control of lactation. *Reprod Nutr Dev*. 42: 117-125.

Huculeci R, Dinu D, Staicu A, Munteanu M, Costache M, Dinischioto A. (2008). Malathion-induced alteration of the antioxidant defense system in kidney, gill, and intestine of *Carassius auratus gibelio*. *Envirom Toxicol*. 24: 523-530.

Hunter RH, Polge C. (1966). Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fert*. 12: 525-531.

INEGI. Banco de Información Económica. 2006 [cited 2007].

John S, Kale M, Rathure N, Bhathagar D. (2001). Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem*. 12:500-504.

Jonakovic M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*. 166: 139–160.

Kalender S, Kalender Y, Durak D, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Cevrimli BS, Yildirim M. (2007). Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pestic Biochem Phys*. 88: 213-218.

- Kharche, S. D., A. K. Goel, S. K. Jindal, N. K. Sinha. (2006). *In vitro* maturation of caprine oocytes in different concentrations of estrous goat serum. *Small Ruminant Research*. 64: 186-189.
- Khrrer JP. (1993). Free radicals as mediator of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol*. 23: 21–48.
- Kimmel GL, Clegg ED, Crisp TM. (1995). Reproductive toxicology testing: a risk assessment perspective. In: Witorsch, R.J. (Ed.), *Reproductive Toxicology*, second ed. Raven Press, New York. pp 75–98.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*. 62:1186–1197.
- Li Y, Feng HL, Cao YJ. (2006). Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured *in vitro*. *Fertility and Sterility*. 85: 827–832.
- Lim J, Luderer U. (2011). Oxidative Damage Increases and Antioxidant Gene Expression Decreases with Aging in the Mouse Ovary. *Biol Reprod*. 84:775–782.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 13:896-900.
- Maibach HI, Feldman RJ, Milby TH, Serat WF. (1971). Regional variation in percutaneous penetration in man. *Arch Environ Health*. 23:208–11.
- Manson JM, Kang YJ. (1994). Test methods for assessing female reproductive and developmental Toxicology. In: Hayes AW (ed.) *Principles and methods of toxicology*. 3d. ed. Raven Press New York. 990-1037.

Marroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A. (2000). Biological monitoring of pesticides exposure: a review. *Introduction. Toxicology.* 143: 1-118.

Martínez D, Chamorro G. (2004). Toxicología reproductiva y ambiental. En Albert L. 2004. *Toxicología Ambiental.* Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. pp 131-146.

Massicotte C, Knight K, Van der Schyf CJ, Jortner BS, Ehrich M. (2005). Effects of organophosphorus compounds on ATP production, mitochondrial integrity in cultured cells. *Neurotox Res.* 7: 203–217.

Mattison, DR, DR Plowchalk, MJ Meadows, AZ Al-Juburi, J Gandy, A Malek. (1990). Reproductive toxicity: male and female reproductive systems as targets for chemical injury. *Med Clin N Am.* 74:391-411.

Miclea I, Pacală N, Hettig A, Zăhan M, Miclea V. (2012). Alpha-tocopherol and Ascorbic Acid Combinations Influence the Maturation of Sheep Oocytes. *Anim Sci Biotechnol.* 45:310-313.

Montenegro, R. A. Enero (2001). Informe sobre los riesgos sanitarios y ambientales del malati6n. Córdoba, Argentina.  
(<http://webs.chasque.net/~rapaluy1/malation/informe1.html>Toxicidad del Malati6n).

Moore PD, Clement G, Tchounwou PB. (2010). Malathion-Induced oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity in human liver carcinoma. (Hep G2) cells *Environ Toxicol.* 25: 221-226.

Mourad AM, Soud A, Al-Othman A, Gaber E, Yusuf K, AHMAD J, Al- Khedhairi A. (2011). Hepatoprotective effects of vitamin E/selenium against malathion-induced injuries on the antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rats. *J. Toxicol. Sci.* 36: 285-296.

Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW, Nazar-Stewart V, Kisby GE. (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol.* 227:97–107.

Nakagawa T, Sawada M, Gonzalez FJ, Yokoi T, Kamataki T. (1996). Stable expression of human CYP2E1 in Chinese hamster cells: high sensitivity to N,N dimethylnitrosamine in cytotoxicity testing. *Mutat Res.* 360:181–186.

NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. (2002). Registry of Toxic effects of Chemical Substances: Succinic acid, mercapto-diethyl ester, S-ester with O, O-dimethylphosphorodithioate.

Available from [www.cdc.gov/niosh/rtecs/wm82c80.html](http://www.cdc.gov/niosh/rtecs/wm82c80.html).27.

Ojha A, Srivastava N. (2012). Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins. *Ecotox Environ Safe.* 75:230-241.

Olgun S, Misra HP. (2006). Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. *Molec and Cell Biochem.* 290:137-144.

Olson SE, Seidel GE. (2000). Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod.* 62: 248–252.

OMS. Organización Mundial de la Salud, International Programme on Chemical Safety: Organophosphorus Insecticides-A General Introduction. Geneve, Switeerland. Environmental Health Criteria, No. 63. (1986).

Peng X, Liu T, Zhang Y. (2008). Addition of Alpha-Tocopherol to Culture Medium Improves the Quality and Cryosurvival of Nuclear-Transferred Ovine Embryos. *J Reprod Dev* 54:403-407.



- Planchot M, Mandelbaum J. (1990). Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth *in vitro*. Br Med Bull, 46: 675-694.
- Pluth JM, O'Neill JP, Nicklas JA, Albertini RJ. (1998). Molecular bases of *hprt* mutations in malathion-treated human T-lymphocytes. Mutat Res. 397: 137-48.
- Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Filho D, Dal-Pizzol F. (2007). Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. Environ Toxicol and Pharmacol. 23:198-204.
- Rajkovic A, Pangas S, Matzuk M. (2006). "Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models". En: Knobil E, Neill J (Eds.) "The Physiology of Reproduction". 3<sup>a</sup> edición. Raven Press. New York. 2: 2063-2102.
- Ranjbar A, Hossein GM, Sharifzadeh M, Golestani A, Ghazi-Khansari M, Baeri M, Abdollahi M. (2010). Protection by pentoxifylline of malathion-induced toxic stress and mitochondrial damage in rat brain. C.R. Biologies. 29: 851-864.
- Reigart JR, Roberts JR. Organophosphate insecticides. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 5th ed; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC. (1999). pp.34-47.
- Rezg R, Mornagui B, El Fazaa S, Ghrabi N. (2008). Biochemical evaluation of hepatic damage in subchronic exposure to malathion in rats: Effect on superoxide dismutase and catalase activities using native PAGE. C.R Biologies. 331: 655-662.
- Rhee SG. (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. J Am Soc Nephrol 14: 211S-215S.
- Richard, F J. (2007). Regulation of meiotic maturation. Journal of Animal Science. 85: E4-E6.

Roberts TR. Metabolic Pathways of Agrochemicals-Part 2: Insecticides and Fungicides; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK. (1998). pp.360–367.

Ruder HE, Harman JT, Blumberg J, Goldman M. (2008). Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reproduction*. 14:345-357.

Russo G. (2007). Ins and outs of dietary phytochemicals, in cancer chemoprevention. *Biochemical. Pharmacology*. 74:533-544.

Saadi L, Lebaili N, Benyoussi M. (2008). Exploration of cytotoxic effect of malathion on some rat organs structure. *Commun Agri Appl Biol Sci*.4:875–81.

Sadi G, Bozan D, Yildiz H. (2014). Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem*. 393: 111-122.

Saikhun K, Faisaikarm T, Ming Z, Lu KH, Kitiyanant Y. (2008).  $\alpha$ -Tocopherol and L-ascorbic acid increase the in vitro development of IVM/IVF swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Animal*. 2:1486-1490.

Salazar S, Ducolomb Y, Betancour M, Bonilla E, Cortés L, Hernández F, González H. (2007). Gene expression analysis on the early development of pig embryos exposed to malathion. *Int J Toxicol*. 26:143-149.

Sánchez P, Reyes BE., López C, Recio R, Morán MJ, Cebrián ME, Quintanilla.V. (2004). Organophosphorus pesticides exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharma*. 196:108-113.

Sanghi R, Pillai MKK, Jayalekshmi TR, Nair A. (2003). Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum Exp Toxicol*. 22:73–6.

Santos RR, Schoevers EJ, Roelen BA. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reprod Biol Endocrinol* 26:112-117.

Sato, E., M. Matsuo, H. Miyamoto. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *JAnim Sci.* 68: 1182-1187.

Sharpe RM. (2000). Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br Med Bull.* 56: 630-42.

Shimada H, Kasakura S, Shiotani M, Nakamura K, Ikeuchi M, Hoshino T, Komatsu T, Ihara Y, Sohma M, Maeda Y, Masuura R, Nakamura S, Hine C, Ohkura N, Kato H. (2001). Hypocoagulable state of human preovulatory ovarian follicular fluid: role of sulfated proteoglycan and tissue factor pathway inhibitor in the fluid. *Biol Reprod.* 64: 1739-1745.

SIAP (2009). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA (México).

Takami M, Preston SL, Toyloy VA, Behrman HR. (1999). Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol.* 276:E684-E688.

Tamura H, Takasaki A, Miwa I. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res.* 44:280–287.

Tanghe S, Soom AV, Nauwynck H, Coryn M, Kruif A. (2002). Minireview: Functions of the Cumulus Oophorus During Oocyte Maturation, Ovulation, and Fertilization. *Mol Reprod Develop.* 61:414-424.

Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. (2000). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 3:805-810.

Tchounwou PB, Patlolla AK, Yedjou CG, Moore PD. (2015). Environmental Exposure and Health Effects Associated with Malathion Toxicity. InTech. Capítulo 3. pp 73-74.

Tomlin CDS. (2006). The Pesticide Manual, a World Compendium. British Crop Protection Council. Alton, Hampshire, UK. 14: 642–643.

Tosca L, Uzbekova C, Chabrolle, Dupont J. (2007). Possible role of 5'AMP activated protein kinase in the metformin mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during *in vitro* maturation. Biol Reprod. 77: 452-465.

Tos-Luty S, Obuchowska-Przebi D, Latuszynska J. (2003). Dermal and oral toxicity of Malathion in rats. Ann Agric Environ Med. 10:101-106.

TOXNET. National Library of Medicine: Hazardous Substances Databank. Medlars Management Section, Bethesda, MD. (1992).

Trentacoste S, Friedmam A, Youker R, Breckenridge C, Zirkin B. (2001). Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. J Androl. 22:142-148.

Trounson, A., C. Anderiesz, G. Jones. (2001). Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. Reproduction. 121: 51-75.

Turner KJ, McIntyre BS, Phillips SL. (2003). Altered gene expression during rat Wolffian duct development in response to *in utero* to the antiandrogen linuron. Toxicol Sci. 74:114-128.

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. (1998). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleous formation at intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 13:1864-1871.

USEPA: Revised Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion; EPA 738-R-06-030; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic

Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing office: Washington DC. (2009).

Uygun U, Koksel H, Atli A. (2005). Residue levels of malathion and its metabolites and fenitrothion in post-harvest treated wheat during storage, milling and baking. *Food Chem.* 92:643–7.

Valdes-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, Hernandez E, Kershenovich D, Gutierrez-Ruiz M.C, Gomez-Quiroz LE. (2009). Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med.* 47, 424-30.

Vatzias G, Hagen DR. (1999). Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Biol Reprod.* 60:42-48.

Venereo GJ. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31:126-133.

Wagner SL. (1997). Diagnosis and treatment of organophosphate and carbamate intoxication. *Occup. Med.: State of the Art Reviews.* 2:239–249.

Wall RJ. (1997). A new lease on life for transgenic livestock. *Nat Biotechnol.* 15: 416-417.

Wang T. (1991). Assimilation of malathion in the Indian River estuary, Florida. *Bull Environ Contam Toxicol.* 47:238–43.

Wang W, Niwa K. (1995). Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocyte in a serum free medium. *Zygote.* 3:345-350.

Wani, N. (2002). In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Res.* 44: 89-95.

Ware GW. *The Pesticide Book*. Fresno CA: Thomson Publications 2000; pp.178–183.

- Winter. (2003). Insecticide Factsheet Malathion. *J Pesticide Reform*. 4:10-15.
- Wongsrikeao P, Augung B, Taniguchi M, Kunishi M, Soto S, Otoi T. (2007). Improvement of transgenic cloning efficiencies by culturing recipient oocytes and donor cells with antioxidant vitamins in cattle. *Mol Reprod Dev*. 74:694-702.
- Xian T. Lu, Ma Y, Wang C, Xiao F. Zhang, Da Q. Jin, Huang C. (2012). Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *J Environ Sci Health, Part B*. 47: 445–454.
- Yarsan E, Tanyuksel H, Celik S, Aydin A. (1999). Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bull Environ Contam Toxicol*. 63:575-581.
- Young J, McNeilly A. (2010). “Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle”. *Reproduction*. 140:489–504.
- Zahm SH, Weisenburger DD, Saal RC, Vaught JB, Babbitt PA, Blair A. (1993). The role of agricultural pesticide use in the development of non Hodgkin's lymphoma in woman arch. *Environ Health*. 48:353–8.
- Zeid MMA, El-barouty G, Abdel-Reheim E, Blancato J, Dary C, El-Sebae AH, Saleh M. (1993). Malathion's disposition in dermally and orally treated rats and its impact on the blood serum acetylcholine esterase and protein profile. *J Environ Sci Health, Part B*. 28(4):413–30.

# Oxidative stress as a damage mechanism in porcine cumulus-oocyte complexes exposed to malathion during in vitro maturation

Diana Flores<sup>1,2</sup> | Verónica Souza<sup>1</sup> | Miguel Betancourt<sup>1</sup> | Mario Teteltila<sup>1</sup> |  
Humberto González-Márquez<sup>1</sup> | Eduardo Casas<sup>1</sup> | Edmundo Bonilla<sup>1</sup> |  
Patricia Ramírez-Noguera<sup>3</sup> | María Concepción Gutiérrez-Ruíz<sup>1</sup> | Yvonne Ducolomb<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México

<sup>2</sup>Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, 09340 DF, México

<sup>3</sup>Laboratorio de Toxicología Celular (L-9), Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México

## Correspondence

Yvonne Ducolomb, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, 09340, Ciudad de México.

Email: duco@xanum.uam.mx

## Funding Information

This study was partially supported by CONACYT, 248824

## Abstract

Malathion is one of the most commonly used insecticides. Recent findings have demonstrated that it induces oxidative stress in somatic cells, but there are not enough studies that have demonstrated this effect in germ cells. Malathion impairs porcine oocyte viability and maturation, but studies have not shown how oxidative stress damages maturation and which biochemical mechanisms are affected in this process in cumulus-oocyte complexes (COCs). The aims of the present study were to determine the amount of oxidative stress produced by malathion in porcine COCs matured in vitro, to define how biochemical mechanisms affect this process, and determine whether trolox can attenuate oxidative damage. Sublethal concentrations 0, 750, and 1000  $\mu\text{M}$  were used to evaluate antioxidant enzyme expressions, reactive oxygen species (ROS production), protein oxidation, and lipid peroxidation, among other oxidation products. COCs viability and oocyte maturation decreased in a concentration-dependent manner. Malathion increased Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1), glutathione-S-transferase (GST), and glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) protein level and decreased glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) protein level. Species reactives of oxygen (ROS), protein oxidation and Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels increased in COCs exposed to the insecticide, but when COCs were pre-treated with the trolox (50  $\mu\text{M}$ ) 30 min before and during malathion exposure, these parameters decreased down to control levels. This study showed that malathion has a detrimental effect on COCs during in vitro maturation, inducing oxidative stress, while trolox attenuated malathion toxicity by decreasing oxidative damage.

## KEYWORDS

in vitro maturation, malathion, oocyte, oxidative stress, porcine, trolox

## 1 | INTRODUCTION

Malathion is one of the most commonly used organophosphorus (OPs) insecticides,<sup>1</sup> which is employed to control pests that affect agricultural crops, ornamental plants, greenhouses, livestock, stored grains, forests, buildings, and gardens.<sup>2</sup> The main routes of exposure to malathion include ingestion through contaminated food and drinking water, inhalation during production, the handling and application of insecticides, and dermal contact with contaminated soil and plants, as malathion is efficiently absorbed by oral, dermal, conjunctival, gastrointestinal, and

respiratory pathways.<sup>3</sup> This insecticide induces toxicity through the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by phosphorylation of serine residues in its active center and subsequent activation of cholinergic receptors inducing neurotoxicity.<sup>4</sup> Besides, malathion, may disrupt other biochemical targets as muscarinic and nicotinic receptors.<sup>5,6</sup> It could interfere with hormone levels, activating estrogen, androgen and other hormone receptors.

In vivo and in vitro studies suggest that malathion can produce deleterious effects on somatic and germ cells in mice.<sup>3,7,8</sup> Malathion induces ovarian cycle irregularities by altering the number of estrus cycles

and its phases, affecting female reproduction.<sup>9</sup> Exposure to malathion could result in infertility decline, miscarriages, and birth defects. Malathion affected gonadal development and mRNA expression of steroidogenic genes in rare adult minnow.<sup>10</sup>

In previous studies, it was shown that malathion impairs oogenesis in mouse<sup>8</sup> and porcine oocytes by affecting viability and *in vitro* maturation (IVM),<sup>11</sup> *in vitro* fertilization and embryo development.<sup>12</sup>

Malathion has been shown to produce oxidative stress in somatic cells in fish, humans fetuses, and rats,<sup>13–16</sup> altering the antioxidant defense system in erythrocytes,<sup>17</sup> plasma,<sup>13</sup> liver,<sup>18</sup> pancreas, muscle, and brain.<sup>6,19</sup>

The mitochondria are the major target cell organelle of OPs as malathion. Mitochondrial metabolism is responsible for the generation of free radicals. The exposure to OPs could result in the production of free radicals and the inactivation of components of mitochondrial respiratory chain.<sup>19</sup>

Oxidative stress can influence oocyte maturation, affecting fertilization and impairing embryo development, high ROS concentrations in follicular fluid were correlated with poor oocyte quality.<sup>20,21</sup> In female germ cells, there are few *in vitro* studies regarding the effect of malathion and its possible action mechanisms. As oocyte maturation is a critical prerequisite for subsequent fertilization and embryo development, disruption of this process has considerable potential to impair female reproduction,<sup>22</sup> but no studies have shown how oxidative stress affects maturation and which biochemical mechanisms are affected in this process.

In the present study COCs were used as a model, because we wanted to mimic the natural *in vivo* conditions in which oocytes perform maturation. Cumulus cells play an important role in oocyte meiotic maturation for supporting the progress to the metaphase II stage and protect oocytes against cell damage produced by oxidative stress during maturation.<sup>23–26</sup>

Porcine was chosen as an animal model because its physiology, anatomy, and biochemistry, including the reproductive and endocrine systems, are very similar to humans.<sup>12,27,28</sup>

The aims of the present study were to determine the amount of oxidative stress produced by malathion in porcine cumulus-oocyte complexes (COCs) matured *in vitro*, to define how the biochemical mechanisms are affected during this process, and to determine whether trolox can attenuate oxidative damage.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

All incubations were performed at 38.5°C with 5% CO<sub>2</sub> in air and humidity at saturation.

Except maturation analysis, which was performed in denuded oocytes, viability and all biochemical assays were evaluated in COCs. All parameters were assessed after 44 h of maturation culture.<sup>21</sup>

### 2.1 | COCs collection and IVM

Ovaries were collected from slaughtered pre-pubertal female pigs and were transported to the laboratory in less than 2 h in 0.157 M NaCl

solution containing 75 µg/mL of penicillin G potassium salt and 50 µg/mL of streptomycin sulfate salt, maintained at 25 to 28°C. COCs were aspirated from 3 to 6 mm ovarian follicles using an 18-gauge needle and a 10 mL disposable syringe. Follicular fluid was collected in a centrifuge tube allowing settling. The supernatant was discarded and the cell pellet was washed twice with Tyrode modified medium supplemented with 10 mM sodium lactate, 10 mM HEPES and 1 mg/mL polyvinyl alcohol (PVA) (TL-HEPES-PVA) at pH 7.3 to 7.4. COCs with oocytes surrounded by a dense cumulus with and uniform cytoplasm<sup>29</sup> were selected and washed three times in 500 µL of protein free maturation medium (TCM 199) with Earle's salts and 26.2 mM sodium bicarbonate (In Vitro, Mexico) supplemented with 0.1% PVA, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 10 ng/mL EGF, 0.5 µg/mL LH, and 0.5 µg/mL FSH.

Fifty COCs were placed in each well of a four-well dish containing 500 µL of maturation medium covered with mineral oil and incubated for 44 h for IVM.<sup>30</sup>

### 2.2 | Malathion treatment

To evaluate the effect of the insecticide on COCs viability and oocyte maturation, technical grade malathion was used. A 10 mM stock solution was prepared in 1% DMSO. For IVM experiments we used 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, and 3000 µM of malathion per well with a final volume of 500 µL of maturation medium. COCs were incubated with the insecticide during IVM (44 h).

### 2.3 | Trolox treatment

Trolox (6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) is a water-soluble analog of α-tocopherol (Vitamin E). Trolox stock solution (5 mM) was prepared in absolute ethanol.

COCs were divided into non-treated (control) and experimental groups: COCs exposure to 750 and 1000 µM malathion; and COCs pretreated with trolox (50 µM) 30 min before, and during malathion exposure for 44 h. Fifty COCs were in each 500 µL drop of maturation medium in four-well plates.

### 2.4 | COCs viability and oocyte maturation assessment

The viability of COCs was assessed by two methods: viability was assessed by the crystal violet-staining assay technique via spectrophotometry according to Nakagawa et al.<sup>31</sup> Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) staining was used to confirm these results. After IVM, COCs were washed in TL-HEPES and incubated in 0.5 mg/mL (MTT) for 1 h to evaluate viability. Purple-stained COCs were considered alive when evaluated under a light microscope.<sup>11</sup>

### 2.5 | Oocyte maturation assessment

After IVM, cumulus cells were mechanically removed from COCs, the oocytes were washed in a 400-µL drop of PBS, transferred to 300 µL of 10 µg/ml bisbenzimidazole (Hoechst 33342) for 45 min and then rinsed



in a 400- $\mu$ L drop of PBS. Finally, the oocytes were fixed overnight with 2% glutaraldehyde in PBS and mounted in PBS-glycerol (1:9). Maturation was analyzed using an epifluorescence microscope (Zeiss Axiostar) at 400 $\times$  with an excitation wavelength of 482 nm. Oocytes with a germinal vesicle (GV) were considered immature, those in the first metaphase (MI) were considered to be maturing, and those exhibiting the second metaphase (MII) and a polar body were classified as matured.

## 2.6 | Oxidative stress parameters

### 2.6.1 | Reactive oxygen species quantification

Reactive oxygen species (ROS) content was estimated using 2'-7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH), a cell-permeable non-fluorescent probe that is esterified in cells and converted to the highly fluorescent 2'-7'-dichlorofluorescein upon oxidation by reactive oxygen species, particularly peroxides.<sup>32</sup> DCFH was added to all cultures at a final concentration of 5  $\mu$ M for 30 min, and then the cultures were harvested to determine ROS levels.

DCFH-derived fluorescence was monitored using a DTX 880 multimodal detector (Beckman Coulter) with an excitation wavelength of 480 and an emission wavelength of 520 nm.

### 2.6.2 | Antioxidant enzymes expression

For the preliminary results of viability and maturation upon exposure to 0, 750, or 1000  $\mu$ M malathion, the oxidation of lipids and proteins, the expression of antioxidant enzymes, and ROS generation were determined in the COCs.

The antioxidant enzyme expression was determined by Western blot. The expressions of five antioxidants enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), and glutathione-S-transferase (GST), were determined in the COCs exposed to malathion for 44 h during IVM. One hundred COCs were prepared in lysis buffer containing a protease (Complete Mini)/phosphatase inhibitor (PhosSTOP) cocktail (Roche). Twenty micrograms of protein from the COCs lysate was subjected to electrophoresis on 4% to 20% Criterion polyacrylamide gels (Bio-Rad) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Protein transfer was verified by staining nitrocellulose membranes with Ponceau-S. Membranes were blocked for 1.5 h with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4) containing 0.05% (wt/vol) Tween 20 (TTBS). The membranes were washed three times in TTBS and probed for 12 h with the following primary antibodies: goat anti-SOD, goat anti-CAT, goat anti-GPx (all 1:1000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-GST (1:200; Santa Cruz Biotechnology), and rabbit anti-G6PD (1:500; Santa Cruz Biotechnology). Following primary antibody incubation, the membranes were incubated for 1 h with the subsequent secondary antibodies: mouse anti-goat (1:8000; Santa Cruz Biotechnology), and anti-rabbit IgG (1:8000; GE Healthcare). Both primary and secondary antibodies were used in TTBS, all incubation steps were performed at room temperature under gentle shaking.

Immunoreaction was detected using an Immobilon<sup>TM</sup> Western enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Millipore). The

images were obtained using Kodak Imagen Gel Doc.  $\beta$ -actin was used to normalize the protein band intensities. Labeling intensity was quantified using Kodak Image Gel Doc software (v 3.1).

### 2.6.3 | Protein content determination

COCs protein concentration was determined using a bicinchoninic acid (BCA) kit (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions.

### 2.6.4 | Detection of oxidized proteins

Oxidized carbonyl groups on proteins were detected via the oxyblot procedure using an OxiBlot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore). The procedure allows for the detection of carbonyl groups introduced to cellular proteins via oxidative reactions with oxides of nitrogen or ozone or by metal catalyzed oxidation. After gel electrophoresis and electrotransfer to a nitrocellulose membrane, the carbonyl groups on the protein side chains were converted to 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone) via reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). A general Western blot protocol was followed. The derived DNP proteins were detected by incubation with a primary antibody specific to the DNP moiety proteins, rabbit anti-DNP (1:150), and followed by incubation with a secondary antibody, goat anti-rabbit IgG (1:300), both in 5% nonfat milk-TTBS. Subsequently, the chemiluminescence of the HRP signal was detected. The presence of carbonyl groups was qualitatively determined by the band intensity on the nitrocellulose membrane.

### 2.6.7 | Measurement of TBARS levels

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which are byproducts of lipid peroxidation and other oxidative mechanisms, were analyzed in the COCs. One hundred COCs exposed to different malathion concentrations were homogenized and mixed with 190  $\mu$ L of 10% (w/v) trichloroacetic acid and HCl and with 190  $\mu$ L of 0.67% (w/v) thiobarbituric acid. The COCs were then heated in a boiling water bath for 1 h at 90°C. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm.<sup>33</sup>

## 2.11 | Statistical analysis

Because the data were discrete variables, nonparametric statistical tests were performed. All assays were performed at least three times. The correlations between malathion concentration and its effects on oocyte viability and maturation were assessed using Spearman's rank correlation coefficients.

The concentration required to produce death of 50% of the oocytes (LC<sub>50</sub>) and the concentration needed to inhibit maturation of 50% of the oocytes (IMC<sub>50</sub>) were calculated by a non-linear regression Probit estimation. The meiotic phase percentage measured for each concentration was compared to the control using  $\chi^2$  tests. One-way analysis of variance and post hoc Bonferroni tests were used to analyze the levels of ROS, TBARS, protein oxidation, and antioxidant enzyme expression. Analyses were performed using GraphPad Prism statistical software, Version 6.0. A probability of ( $P < .05$ ) was considered statistically significant.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Effect of malathion on viability and maturation

Viability and maturation was assessed in 540 COCs in three independent assays for 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, and 3000  $\mu\text{M}$  malathion concentrations. The COCs viability and maturation after 44 h of maturation decreased as malathion concentration was increased in the maturation medium. Spearman's correlation coefficient was significant for viability ( $r^2 = -0.91$ ) and maturation ( $r^2 = -0.74$ ). The calculated  $\text{LC}_{50}$  value was 1700  $\mu\text{M}$ , and the calculated  $\text{IMC}_{50}$  was 750  $\mu\text{M}$  (data not shown).

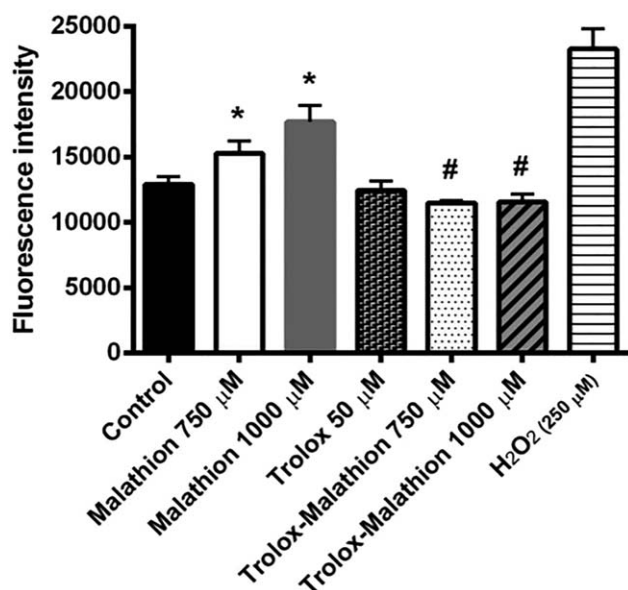
#### 3.2 | Effect of malathion on ROS production in COCs

A total of 630 COCs was evaluated in three independent assays performed by duplicate (45 per treatment).

Two concentrations of malathion, the  $\text{IMC}_{50}$  (750  $\mu\text{M}$ ) and a sublethal concentration (1000  $\mu\text{M}$ ), were chosen to quantify ROS and all other oxidative stress parameters.

When COCs were exposed to 750 and 1000  $\mu\text{M}$  of malathion, ROS significantly increased by 18 and 37%, respectively, compared to control (0  $\mu\text{M}$ ) ( $*P < .05$ ).

In COCs exposed to 750 and 1000  $\mu\text{M}$  malathion in combination with trolox (50  $\mu\text{M}$ ), ROS levels significantly decreased (by 12 and 11%, respectively;  $*P < .05$ ) compared to the two malathion concentrations. All trolox treatments showed similar ROS levels to the control group (Figure 1).



**FIGURE 1** Influence of malathion on ROS production in COCs after 44 h of culture and its effect in COCs pretreated with trolox (50  $\mu\text{M}$ ) for 30 min before malathion exposure. ROS evaluation was assessed by DCFH-DA fluorescence intensity. A total of 630 COCs were evaluated in three independent assays with a duplicate (45 per treatment). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250  $\mu\text{M}$ ) was used as the positive control of ROS. Values represent mean  $\pm$  SD. ( $*P < .05$ ) in relation to control and ( $\#P < .05$ ) in relation to malathion

#### 3.3 | Effect of malathion on antioxidant enzyme expression

For each of the five enzymes analyzed, 100 COCs were evaluated in at least three independent assays.

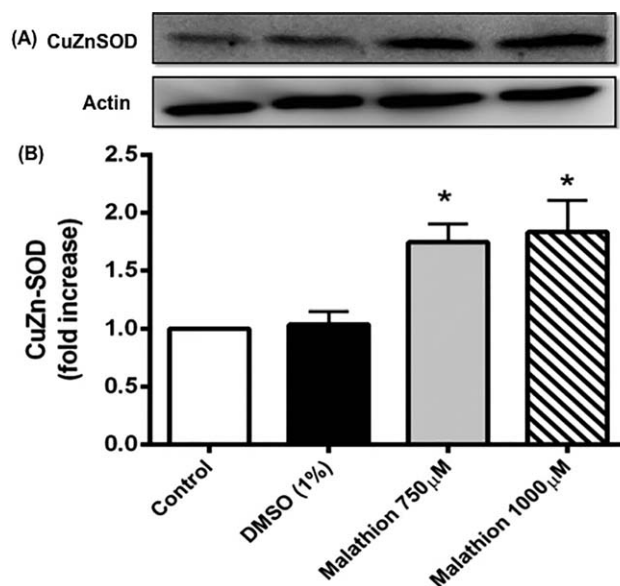
When COCs were exposed to 750 and 1000  $\mu\text{M}$  of malathion, significant increases in CuZn-SOD (0.74- and 0.83-fold, respectively), glutathione-S-transferase (0.61- and 0.40-fold, respectively) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (1.51- and 3.4-fold, respectively) were observed with respect to the control group ( $P < .05$ ) (Figures 2–4, respectively).

Significant decreases in catalase (0.33- and 0.90-fold, respectively) and glutathione peroxidase expression levels (0.65- and 0.90-fold, respectively) were observed in COCs exposed to 750 and 1000  $\mu\text{M}$  malathion ( $P < .05$ ) (Figures 5 and 6, respectively).

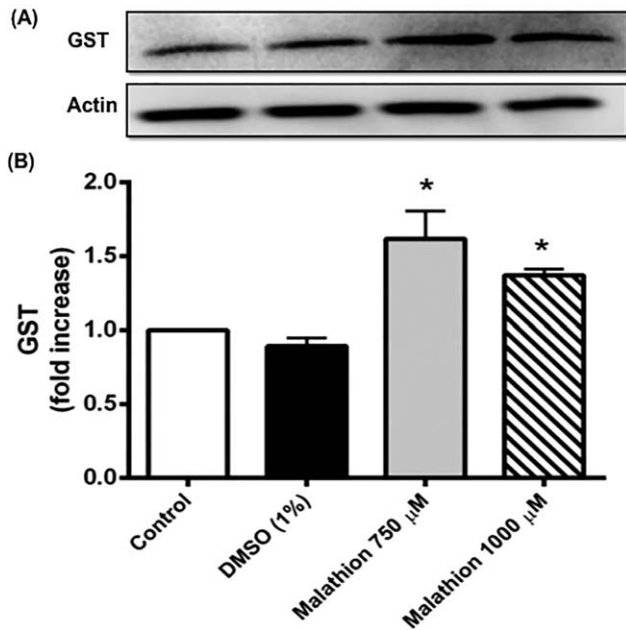
#### 3.4 | Effect of malathion on protein oxidation

A total of 1800 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment).

The oxyblot assay showed an increase in carbonyl group content in the COCs exposed to 750 or 1000  $\mu\text{M}$  malathion compared to the control COCs, suggesting cellular protein oxidation in COCs after malathion exposure. The high level of protein carbonyl was reduced when trolox (50  $\mu\text{M}$ ) was added to the culture before malathion exposure (Figure 7).



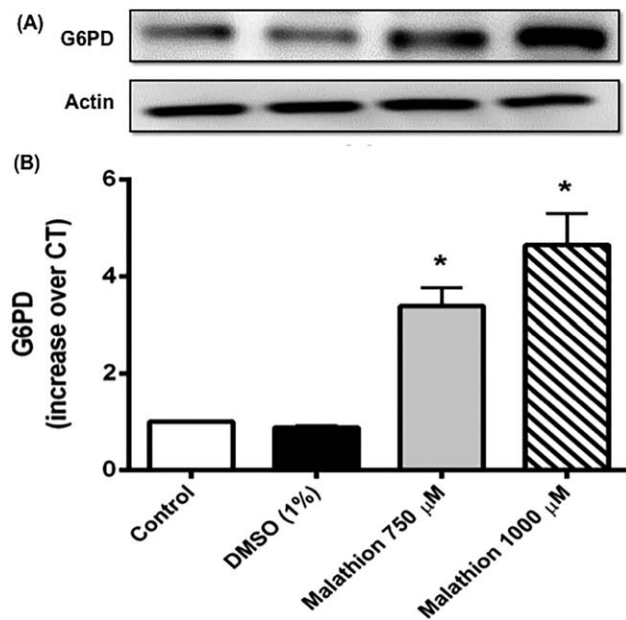
**FIGURE 2** Influence of malathion on CuZn-SOD expression in COCs after 44 h of culture. Western-Blot analysis was performed (20  $\mu\text{g}$  of each protein sample were loaded). Bands were quantified by densitometry and normalized to the actin. A total of 1200 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment). Values represent mean  $\pm$  SD. \*Significant difference versus the control ( $P < .05$ )



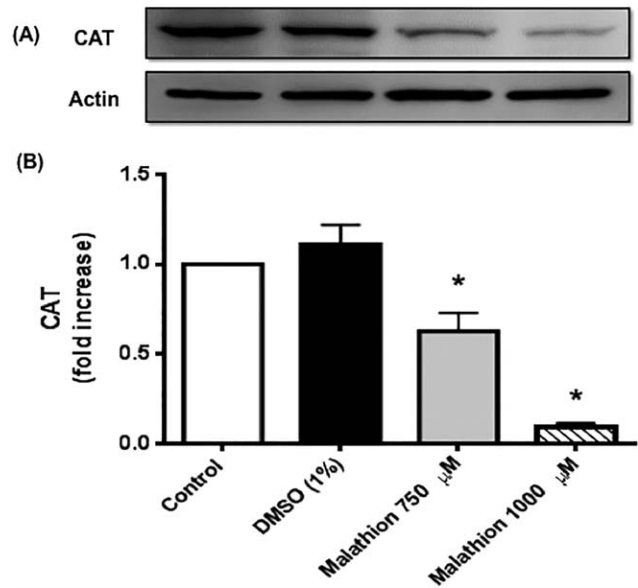
**FIGURE 3** Influence of malathion on GST expression in COCs after 44 h of culture. Western-Blot analysis was performed (20  $\mu\text{g}$  of each protein sample were loaded). Bands were quantified by densitometry and normalized to the actin. A total of 1200 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment). Values represent mean  $\pm$  SD. \*Significant difference versus the control ( $P < .05$ )

### 3.5 | Effect of malathion on the TBARS levels

A total of 1800 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment).

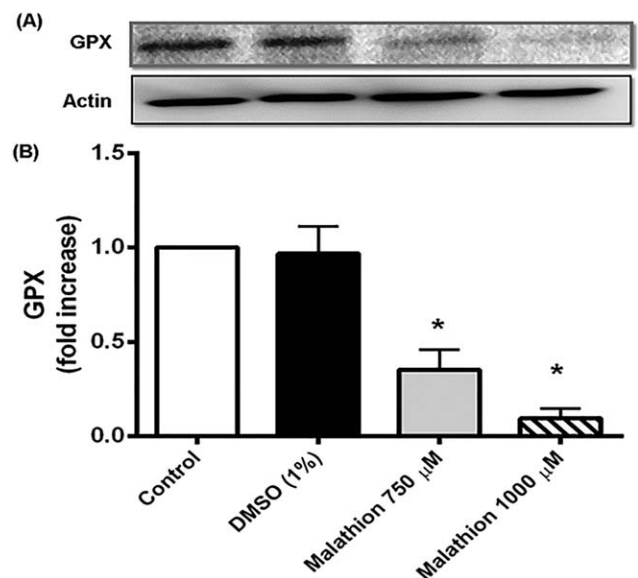


**FIGURE 4** Influence of malathion on G6PD expression in COCs after 44 h of culture. Western-Blot analysis was performed (20  $\mu\text{g}$  of each protein sample were loaded). Bands were quantified by densitometry and normalized to the actin. A total of 1200 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment). Values represent mean  $\pm$  SD. \*Significant difference versus the control ( $P < .05$ )



**FIGURE 5** Influence of malathion on CAT expression in COCs after 44 h of culture. Western-Blot analysis was performed (20  $\mu\text{g}$  of each protein sample were loaded). Bands were quantified by densitometry and normalized to the actin. A total of 1200 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment). Values represent mean  $\pm$  SD. \*Significant difference versus the control ( $P < .05$ )

Compared with control, COCs exposed to 750 and 1000  $\mu\text{M}$  malathion showed a significant increase in TBARS concentrations (0.025 and 0.040  $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$  protein, respectively).



**FIGURE 6** Influence of malathion on GPX expression in COCs after 44 h of culture. Western-Blot analysis was performed (20  $\mu\text{g}$  of each protein sample were loaded). Bands were quantified by densitometry and normalized to the actin. A total of 1200 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment). Values represent mean  $\pm$  SD. \*Significant difference versus the control ( $P < .05$ )

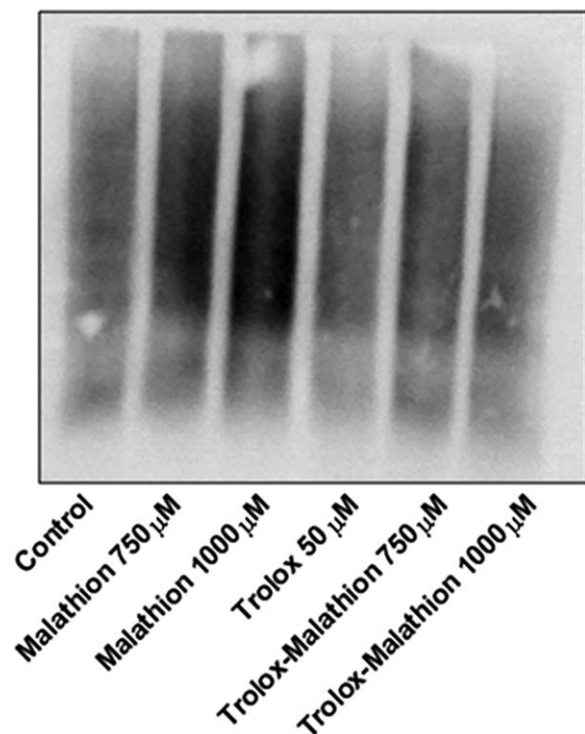


FIGURE 7 Influence of malathion on protein oxidation levels in COCs after 44 h of culture and its effect in COCs pretreated with trolox (50  $\mu$ M) for 30 min before malathion exposure. A total of 1800 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment)

Trolox pre-treatment significantly decreased the concentration of TBARS to 0.01 and 0.02  $\mu$ mol/ $\mu$ g protein compared to the 750 and 1000  $\mu$ M malathion groups, respectively ( $\#P < .05$ ), suggesting that trolox could protect cellular lipids from oxidative damage (Figure 8).

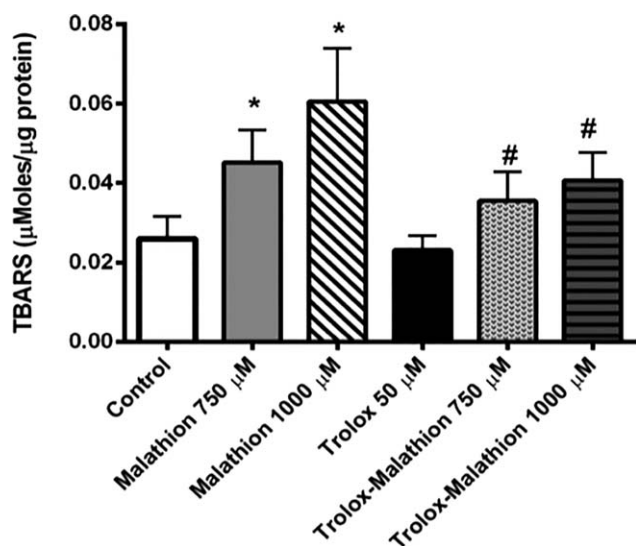


FIGURE 8 Influence of malathion on TBARS levels in COCs after 44 h of culture and its effect in COCs pretreated with trolox (50  $\mu$ M) for 30 min before malathion exposure. TBARS content was evaluated. A total of 1800 COCs were evaluated in three independent assays (100 per treatment). Values represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments. ( $*P < .05$ ) in relation to control and ( $\#P < .05$ ) in relation to the corresponding malathion group

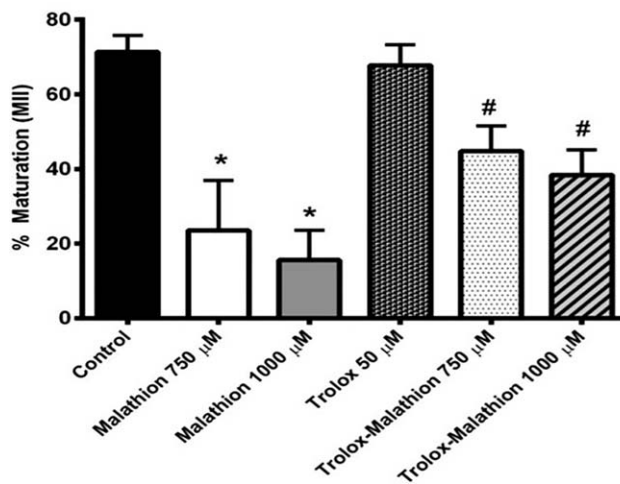


FIGURE 9 Effect of malathion on oocyte maturation after 44 h of culture and its effect in COCs pretreated with trolox (50  $\mu$ M) for 30 min before malathion exposure. A total of 1500 oocytes were analyzed in five independent assays. Oocytes stained by Hoechst 33342 were evaluated with an epifluorescence microscope at  $\times 400$ . Values represent mean  $\pm$  SD. ( $*P < .05$ ) in relation to control and ( $\#P < .05$ ) in relation to the corresponding malathion group

### 3.6 | Effect of malathion on oocyte meiotic phases

A total of 1500 oocytes were analyzed in five independent assays.

Malathion affected oocyte maturation. The concentrations of 750 and 1000  $\mu$ M prevented GV breakdown (54 and 66%, respectively) with respect to the control group ( $*P < .05$ ). The percentage of oocytes at the MII stage decreased as the concentration increased (17 and 25%) compared to controls ( $P < .05$ ).

The percentage of oocytes in the GV stage after trolox (50  $\mu$ M) treatment was similar to controls (12% vs. 11%), but when 750 and 1000  $\mu$ M of malathion was added, the percentage of oocytes in the GV stage significantly decreased (by 21% and 28%, respectively), therefore the percentage of oocytes that reached the MII stage increased (by 45% and 37%, respectively) compared to those exposed to only malathion in the dose range tested ( $P < .05$ ) (Figure 9 and Table 1). This may be related to the modulatory antioxidant effects induced by trolox during oocyte maturation before malathion exposure.

## 4 | DISCUSSION

Among the most toxic insecticides are OPs, such as malathion. Previous studies have shown that insecticides affect oocyte maturation; however, the mechanisms involved have not been explored. The aims of the present study were to analyze the oxidative stress and damage produced by malathion in pig COCs matured in vitro and to determine whether trolox could attenuate the oxidative damage.

In the present study, the  $LC_{50}$  and  $IMC_{50}$  values obtained for technical grade malathion were higher (1000 and 750  $\mu$ M respectively) than those reported by Casas et al.<sup>11</sup> (57 and 25  $\mu$ M, respectively). These differences could be due to unknown impurities with additional highly toxic effect in the commercial malathion used in the previous

TABLE 1 Effect of malathion on oocyte in vitro maturation and the protective effect of trolox antioxidant

Treatment concentrations ( $\mu\text{M}$ )	Total number	Oocytes in GV/total (%)	Oocytes in MI/total (%)	Oocytes in MII/total (%)
Control (0)	183	21/183 (11)	32/183 (17)	130/183 (72)
Malathion (750)	185	99/185 (54) <sup>a</sup>	40/185 (21)	46/185 (25) <sup>a</sup>
Malathion (1000)	167	110/167 (66) <sup>a</sup>	28/167 (17)	29/167 (17) <sup>a</sup>
Trolox (50)	168	20/168 (12)	34/168 (20)	114/168 (68)
Trolox-malathion (750)	202	43/202 (21) <sup>b</sup>	68/202 (34) <sup>b</sup>	91/202 (45) <sup>b</sup>
Trolox-malathion (1000)	185	52/185 (28) <sup>b</sup>	64/185 (35) <sup>b</sup>	69/185 (37) <sup>b</sup>

The number of oocytes is the total of five assays.

<sup>a</sup>Significant difference to the control ( $P < .05$ ).

<sup>b</sup>Significant difference to malathion ( $P < .05$ ).

GV, germinal vesicle (immature oocytes); MI, metaphase I (oocytes to be mature); MII, metaphase II (matured oocytes).

study. However, a similar concentration-response effect was observed in both cases. OPs as malathion, inhibit AchE activity through the irreversible union with the catalytic site of the enzyme. This enzyme is related with the modulation of the neuromuscular impulse transmission. Besides, it can be related to other non-neuromuscular processes as cell interactions mediated by electrical events and changes in ion concentrations, which occur during the interaction of gametes and embryo development.<sup>5,12</sup>

In the present study, two concentrations of malathion, were chosen to determine whether there was a concentration-dependent relationship between oxidative damage and malathion exposure at the  $\text{IMC}_{50}$  (750  $\mu\text{M}$ ) and sublethal (1000  $\mu\text{M}$ ) concentrations.

The concentration of intracellular ROS was increased in COCs exposed to both concentrations 750 and 1000  $\mu\text{M}$  malathion.

Malathion is an OPs pesticide that has been shown to produce oxidative stress through the generation of free radicals and alteration of the cellular antioxidant defense system.<sup>17</sup>

Oxidative stress can influence oocyte maturation, it has been suggested that ROS may participate in the meiotic arrest impairing embryo development.<sup>21,34</sup> In the present study, the percentage of oocytes in the GV stage remained high, indicating a blockage in meiosis resumption. These results agree with those reported by Tamura et al.,<sup>35</sup> the percentage of murine mature oocytes decreased when hydrogen peroxide was added to the culture medium.

Oocyte maturation requires the normal assembly and function of a meiotic spindle, among the multiple causes that compromise spindle integrity is oxidative stress. This condition induces changes in spindle morphology, alterations in microtubule dynamics and chromosome alignment during maturation of mouse oocytes.<sup>36</sup> Zhang et al.<sup>37</sup> showed a reduction in mitochondrial ATP production of oxidative stress that was associated with defects in mouse oocyte spindles.

In other studies, it has been shown that malathion alters gene expression in morulae, where a decrease in the expression of at least 11 mitochondrial and nuclear genes were observed.<sup>38</sup> In early oogene-

sis, malathion altered the regulation of several genes involved in transcription (BP75), translation (5S ribosomal protein) and mitochondrial function (cytochrome oxidase, units I and III).<sup>8</sup> The OPs seem to perturb homeostasis in the redox state by disrupting mitochondrial metabolism and the activity of antioxidant enzymes.<sup>39</sup> In the present study COCs homogenate was performed to evaluate the protein content of the antioxidant enzymes of different cellular structures such as the cytosol (SOD1, GPx, GST G6PD) and peroxisomes (CAT).

The activity of SOD, GPx, and catalase has been reported by the first time in mammalian female gametes in bovine COCs and denuded oocytes during in vitro maturation.<sup>24</sup>

In the present study, malathion disturbed the content of the five antioxidant enzymes evaluated in COCs after IVM. The content of CuZn-SOD was significantly increased, possibly as a compensatory mechanism in response to the increased production of ROS.

Other enzymes, such as CAT and GSH-Px, protect cells and tissues from oxidative injury regulating redox signaling. In the present study, the expressions of these enzymes were significantly decreased by effect of the malathion.

The results of the present study indicate that enzymes linked to glutathione pathways (GST and GSH-Px) involved in modulating the antioxidant defense system in COCs were affected after malathion exposure, decreased GSH-Px content was accompanied.

Some pesticides (organochlorine and organophosphate) consume GSH through GST synthesis as an adaptive mechanism to counteract oxidative stress situations as a major detoxification route of these chemicals.<sup>40,41</sup> High levels of GST can contribute to efficient detoxification of toxic compounds and eliminating oxidative stress caused by these compounds.<sup>42</sup>

As expected, the insecticide induced an increase in the expression of the G6PD enzyme. This is consistent with a previous study, which suggested that some xenobiotics could induce the expression of G6PD.<sup>43</sup> In various rat tissues, it was observed that OPs exposure induced G6PD activity.<sup>44</sup> This enzyme is involved in the first reaction of the pentose phosphate pathway catalyzed by G6PD is the main site

of NADPH production. An alteration in this enzyme activity affects NADPH generation, disturbing the cell redox status, which is an important indicator of oxidative stress.<sup>44</sup>

Disturbances in the normal redox state of tissues can cause toxic effects through the production of peroxides and free radicals that damage all cell components. In this study, oxidative damage to proteins was evaluated by the presence of carbonyl groups in COCs exposed to malathion for 44 h. Direct ROS attacks on the amino acid side chains of proline, arginine, lysine, and threonine result in protein carbonyl formation, which eventually changes the tertiary structure of proteins, resulting in alterations in its function.<sup>45</sup> In other studies, significant increases in the presence of carbonyl groups were found in rat brain,<sup>6,46</sup> lungs and kidneys<sup>14</sup> exposed to malathion.

Lipids are other biomolecules highly susceptible to be damaged by ROS, and their peroxidation has been suggested as one mechanism involved in pesticide-induced toxicity<sup>40</sup> via damage to membrane phospholipids that decreases membrane fluidity. Thus inducing severe structural changes, reducing membrane-bound enzyme activity, thereby affecting cellular signaling pathways. TBARS are formed as a bioproduct of lipid peroxidation and is one of the major oxidation products of peroxidized polyunsaturated fatty acids. In this study, TBARS levels increased significantly in COCs exposed to malathion. It has previously been demonstrated that malathion increases TBARS levels in several tissues and cells<sup>47</sup> such as, in brain,<sup>48</sup> lymphocytes and erythrocytes,<sup>49</sup> thymocytes,<sup>50</sup> and the HepG2 cell line.<sup>18</sup>

Biological antioxidants such as vitamin C and E control free radical formation or inhibit their reaction with biological molecules. A proposed mechanism of vitamin action is related to hydrogen atom transfer from antioxidant molecules to free radicals.<sup>51</sup> Vitamin E in the cell membrane may prevent OPs-induced oxidative damage.<sup>52</sup> OPs such as malathion has been shown to produce oxidative stress due to the generation of free radicals disturbing the antioxidant defense system in erythrocytes through the generation of free radicals, the antioxidant activity of vitamin E is targeted primarily toward the lipid component of cells<sup>53</sup> it has been shown to inhibit free radical formation and is effective in minimizing lipid peroxidation in different biological systems.<sup>17</sup> Vitamin E (600  $\mu$ M) pre-treatment reversed the subsequent OPs effect on cytotoxicity and genotoxicity in PC12 cells.<sup>54</sup>

Trolox is a promising candidate for attenuating the damage caused by ROS because, as a vitamin E analog, it might reduce oxidation in cell membrane lipids and it has been shown to protect mammalian cells from oxidative damage both in vivo and in vitro.<sup>55</sup> Vitamin E is the most important antioxidant present in ovaries and follicular fluid, and its deficiency affects embryo survival.<sup>56</sup>

Our results showed that COCs pre-treated with trolox (50  $\mu$ M) 30 min before and during malathion exposure through maturation period significant decrease the ROS, protein oxidation and TBARS levels; and increased the percentage of oocyte maturation in COCs compared those exposed only to malthion. In the present study the concentration of 50  $\mu$ M trolox was chosen because it had protective effect in comparison with 100  $\mu$ M concentration which had a toxic effect (data not

shown). Other studies showed that a mixture of 20  $\mu$ M alpha-tocopherol and 750  $\mu$ M ascorbic acid exerted a beneficial effect on cytoplasmic maturation.<sup>57</sup>

Takami et al.<sup>58</sup> showed that rat oocyte maturation did not increase with trolox 100  $\mu$ M. In our study the same concentration increased protein oxidation and had a toxic effect (data not shown).

Our results differ from those reported by other authors who indicate that cell-permeant antioxidants can inhibit spontaneous resumption of meiosis.<sup>24</sup>

This differs with other study in which adding vitamin E (100  $\mu$ M) during in vitro oocyte maturation increased blastocyst formation, decreasing the number of apoptotic blastomeres in cattle.<sup>56</sup> Other studies showed that high concentrations of alpha-tocopherol and ascorbic acid decreased in vitro fertilization in bovine<sup>59</sup> and when it was added to maturation medium had not effect on nuclear maturation in bovine oocytes.<sup>60</sup>

In the embryo production systems, vitamin E has been shown to have beneficial effects; one of its functions is protecting embryos against ROS produced by high concentrations of O<sub>2</sub>.<sup>61</sup> Trolox added to culture medium decrease H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, increase developmental ability to the blastocyst stage, and increase the cell number in porcine embryos produced by IVF.<sup>62</sup>

Reproduction is a complex process comprising gametogenesis, fertilization, embryo and fetal development. Each event is so important that impairment of any of them may seriously affect subsequent stages. Oocyte maturation is a crucial event for fertilization and early embryo development. Oxidative stress may cause improper oocyte maturation, impairing subsequent reproductive outcome.

## CONCLUSIONS

The present study demonstrated that malathion induces oxidative stress in COCs and increased ROS, protein oxidation and TBARS levels, inducing alterations in the antioxidant enzyme expression during in vitro maturation, and trolox attenuated malathion toxicity, decreasing oxidative stress.

These results highlight the importance of studying the effects of environmental pollutants on the maturation of oocytes as a possible cause of alterations in reproductive health, because normal oocyte maturation is a critical prerequisite for subsequent events, such as fertilization and early embryonic development.

Understanding the mechanisms of action of these xenobiotic compounds is a powerful tool and may be of use to prevent undesired effects of such compounds until the development of alternative methods of pest control that are more compatible with humans and the environment.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Elizabeth Reyes Zarate and Patricia Rosales, for technical assistance, Alejandro Domínguez for image edition support, and Los Arcos slaughterhouse, México for providing ovaries. This study was partially supported by CONACYT, 248824.

## REFERENCES

- [1] Pluth M, Nicklas JA, O'Neill JP, Albertini RJ. Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. *Cancer Res.* 1996;56:2393–2399.
- [2] Blasiak J, Jaloszynski P, Trzeciak A, Szyfter K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat Res.* 1999;445:275–283.
- [3] Geng X, Shao H, Zhang Z, Ng J, Peng C. Malathion-induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in male Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;39:654–667.
- [4] Lasram MM, Annabi AB, Rezg R. Effect of short-time Malathion administration on glucose homeostasis in Wistar rat. *Pestic Biochem Phys.* 2008;92:114–119.
- [5] Aluigi MG, Angelini C, Falugi C, et al. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. *Chem Biol Interact.* 2005;157:305–316.
- [6] Fortunato JJ, Feier G, Vitali AM, Petronilo F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochem Res.* 2006;31:671–678.
- [7] Salvadori DM, Ribeiro LR, Pereira CA, Becak W. Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice. *Mutat Res.* 1998;204:283–287.
- [8] Bonilla E, Hernández F, Cortés L, et al. Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early oogenesis in mice in vitro. *Environ Toxicol.* 2008;23:240–245.
- [9] Bretveld RW, Thomas CMG, Scheepers PTJ, Zielhuis GA, Roeleveld N. Pesticide exposure: The hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:30–44.
- [10] Zhang Y, Wu L, Zhang G, Guan Y, Wang Z. Effect of low-dose malathion on the gonadal development of adult rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016;125:135–140.
- [11] Casas E, Bonilla E, Ducoy Y, Betancourt M. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2010;24:224–230.
- [12] Ducoy Y, Casas E, Valdez A, González G, Altamirano-Lozano M, Betancourt M. In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol Toxicol.* 2009;6:623–633.
- [13] Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: A review. *Med Sci Monit.* 2004;10:141–147.
- [14] Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, et al. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007;23:198–204.
- [15] Huculeci R, Dinu D, Staicu A, Munteanu MC, Costache M, Dinischiotu A. Malathion-induced alteration of the antioxidant defence system in kidney, gill, and intestine of *Carassius auratus gibelio*. *Environ Toxicol.* 2009;24:523–530.
- [16] Koc ND, Kayhan FE, Sesal C, Muslu MN. Dose dependent effects of endosulfan and malathion on adult Wistar albino rat ovaries. *Pak J Boil Sci.* 2009; 12:498–503.
- [17] Durak D, Uzun F, Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender F. Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environ Toxicol.* 2008;24:235–242.
- [18] Moore PD, Clement G, Tchounwou PB. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity in human liver carcinoma. (Hep G2) cells. *Environ Toxicol.* 2010;25:221–226.
- [19] Delgado E, Streck E, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. *Neurochem Res.* 2006;31:1021–1025.
- [20] Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod.* 2006;21:2403–2407.
- [21] Alvarez GM, Morado SA, Soto MP, Dalvit GC, Cetica PD. The control of reactive oxygen species influences porcine oocyte in vitro maturation. *Reprod Dom Anim.* 2015;50:200–205.
- [22] Campagna C, Sirard M, Ayotte P, Bailey JL. Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. *Biol Reprod.* 2001;65:554–560.
- [23] Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: Role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 2000;3:805–810.
- [24] Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* 2001;1:57–64.
- [25] Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002;1:256–273.
- [26] Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online* 2009;18:864–880.
- [27] Campagna C, Guillemette C, Paradis R, Sirard MA, Ayotte P, Bailey JL. An environmentally relevant organochlorine mixture impairs sperm function and embryo development in the porcine model. *Biol Reprod.* 2002;67:80–87.
- [28] Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. Advances in swine in vitro embryo production technologies. *Reprod Domest Anim.* 2010;2:40–48.
- [29] Alvarez GM, Dalvit GC, Achi MV, Miguez MS, Cetica PD. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell* 2009;33:167–177.
- [30] Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol Reprod.* 1998;58:1316–1320.
- [31] Nakagawa T, Sawada M, Gonzalez FJ, Yokoi T, Kamataki T. Stable expression of human CYP2E1 in Chinese hamster cells: high sensitivity to N,N dimethylnitrosamine in cytotoxicity testing. *Mutat Res.* 1996;360:181–186.
- [32] Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2008;283:14581–14589.
- [33] Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421–431.
- [34] Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev.* 2000;4:353–360.
- [35] Tamura H, Takasaki A, Miwa I. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res.* 2008;44:280–287.
- [36] Choi WJ, Banerjee J, Falcone T. Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertil Steril.* 2007;88:1220–1231.
- [37] Zhang X, Wu XQ, Lu S. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res.* 2006; 16:841–850.

- [38] Salazar S, Ducolomb Y, Betancour M, et al. Gene expression analysis on the early development of pig embryos exposed to malathion. *Int J Toxicol*. 2007;26:143–149.
- [39] Yarsan E, Tanyuksel H, Celik S, Aydin A. Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1999;63:575–581.
- [40] Khrrer JP. Free radicals as mediator of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23:21–48.
- [41] Zimniak L, Awasthi S, Srivastava SK, Zimniak P. Increased resistance to oxidative stress in transfected cultured cells overexpressing glutathione S-transferase mGSTA4-4. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;143:221–229.
- [42] Xu ZB, Zou XP, Zhang N, Feng QL, Zheng SC. Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. *Insect Sci*. 2015;22:503–511.
- [43] Ursini M, Parrella A, Rosa G, Salzano S, Martini G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem J* 1997;323:801–806.
- [44] Ojha A, Srivastava N. Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins. *Ecotoxicol Environ Safe*. 2012;75:230–241.
- [45] Lim J, Luderer U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol Reprod*. 2011;84:775–782.
- [46] Brocardo P, Pandolfo P, Takahashi R, Rodrigues AL, Dafre A. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 2005;207:283–291.
- [47] Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik JK. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilufos in male rats: A biochemic inter-action study. *Toxicology* 2003;185:1–8.
- [48] Ranjbar A, Hossein GM, Sharifzadeh M, et al. Protection by pentoxifylline of malathion-induced toxic stress and mitochondrial damage in rat brain. *Hum Exp Toxicol*. 2010;29:851–864.
- [49] Muniz JF, McCauley L, Scherer J, et al. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;227:97–107.
- [50] Olgun S, Misra HP. Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. *Mol Cell Biochem*. 2006;290:137–144.
- [51] El-Demerdash Fatma M. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem Toxicol*. 2011;49:1346–1352.
- [52] John S, Kale M, Rathure N, Bhathagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem*. 2001;12:500–504.
- [53] Kalender S, Uzun FG, Durak D, Demir F, Kalender Y. Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamins C and E. *Food Chem Toxicol*. 2010;2:633–638.
- [54] Lu XT, Ma Y, Wang C, Zhang XF, Jinda Q, Huang CJ. Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *J Environ Sci Health B* 2012;47:445–454.
- [55] Saikhun K, Faisaikarm T, Ming Z, Lu KH, Kitiyanant Y.  $\alpha$ -Tocopherol and L-ascorbic acid increase the in vitro development of IVM/IVF swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Animal* 2008;2:1486–1490.
- [56] Wongsrikeao P, Augung B, Taniguchi M, Kunishi M, Soto S, Otoi T. Improvement of transgenic cloning efficiencies by culturing recipient oocytes and donor cells with antioxidant vitamins in cattle. *Mol Reprod Dev*. 2007;74:694–702.
- [57] Miclea I, Pacală N, Hettig A, Zăhan M, Miclea V. Alpha-tocopherol and ascorbic acid combinations influence the maturation of sheep oocytes. *Anim Sci Biotechnol*. 2012;45:310–313.
- [58] Takami M, Preston SL, Toyloy VA, Behrman HR. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol*. 1999;276:E684–E688.
- [59] Dalvit GC, Cetica PD, Beconi MT. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 1998;49:619–627.
- [60] Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN, Beconi MT. Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell* 2005;29:209–212.
- [61] Peng X, Liu T, Zhang Y. Addition of alpha-tocopherol to culture medium improves the quality and cryosurvival of nuclear-transferred ovine embryos. *J Reprod Dev*. 2008;54:403–407.
- [62] Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 2004;62:1186–1197.

**How to cite this article:** Flores DL, Souza V, Betancourt M, et al. Oxidative stress as a damage mechanism in porcine cumulus-oocyte complexes exposed to malathion during in vitro maturation. *Environmental Toxicology*. 2017;00:1–10. <https://doi.org/10.1002/tox.22384>