

---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

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

**EFFECTO DEL ÁCIDO PERFLUOROOCETANOICO EN EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO *IN VITRO* EN EL PORCINO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN ANIMAL

**PRESENTA:**

BIÓL. JIMENA PÉREZ DOMÍNGUEZ

**COMITÉ DE TUTORES:**

DIRECTORA

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ †

ASESORES

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

DRA. MARÍA MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS

CDMX. JULIO DE 2019.

---

---

## **MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES**

### **DIRECTORA:**

**Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez †**

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Biología Celular

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

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

### **ASESORES:**

**Dr. José Miguel Betancourt Rule**

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Biología Celular

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

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

Correo: bet@xanum.uam.mx

**Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos**

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

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

Correo: zayil.salazar@xanum.uam.mx

---

---

## **MIEMBROS DEL JURADO**

### **Dr. José Miguel Betancourt Rule**

Laboratorio de Biología Celular

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

UAM-Iztapalapa

Correo: bet@xanum.uam.mx

### **Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos**

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

UAM-Iztapalapa

Correo: zayil.salazar@xanum.uam.mx

### **Dra. Miriam Fahiel Ávalos Casillas**

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología Reproductiva

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

UAM-Iztapalapa

Correo: fahiel@xanum.uam.mx

### **Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano**

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental

Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. UNAM

Correo: maal@unam.mx

---

---

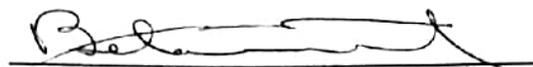
“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT registro 003797”.

Número de CVU 796290 y de becario otorgado por CONACyT 616282.

---

---

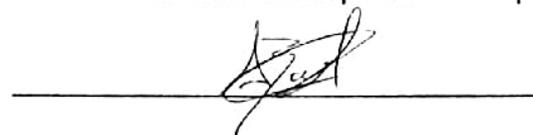
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **"Efecto del ácido perfluorooctanoico en el desarrollo embrionario *in vitro* en el porcino"** que presentó Jimena Pérez Domínguez el día 26 de julio del 2019.



**Presidente**

**Dr. José Miguel Betancourt Rule**

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa



**Secretaria**

**Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos**

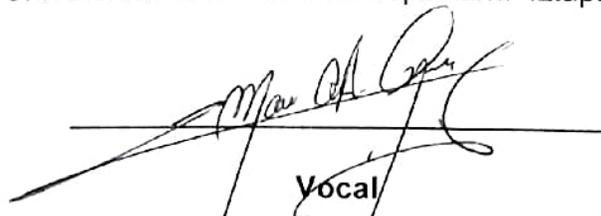
Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa



**Vocal**

**Dra. Miriam Fahiel Casillas Ávalos**

Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa



**Vocal**

**Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano**

Facultad de Estudios Superiores  
Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Con admiración, a la memoria de la Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramirez. Por el apoyo y la confianza depositada en mí desde que llegué al laboratorio. Por transmitirme su pasión por la ciencia y ser una pieza clave en la realización de este proyecto. Su recuerdo quedará en mí por siempre, muchas gracias por todo.

Al Dr. Miguel Betancourt. Por recibirme amablemente en su laboratorio y apoyarme en todo momento. Por sus grandes enseñanzas y valiosas contribuciones en la realización de la tesis, muchas gracias.

A la Dra. Zayil Salazar. Por su gran aportación en el proyecto. Por siempre recibirme gentilmente y con gran disposición. Por sus acertadas observaciones y correcciones, muchas gracias.

A la Dra. Miriam Fahiel Casillas. Por su participación en la corrección de la tesis. Por sus atinadas sugerencias que hicieron enriquecer el trabajo y mirarlo desde otro punto de vista.

Al Dr. Mario Altamirano. Por amablemente aceptar ser parte del jurado.

Al MBRA. Mario Teteltitla. Por ayudarme en la estandarización de técnicas. Por sus grandes consejos. Por compartirme su conocimiento y sobre todo por su gran paciencia y sencillez.

A mis compañeros de laboratorio, Víctor Montesinos y Rebeca Martínez. Por todas las situaciones que pasamos juntos. Por hacer divertido cada experimento. Por el apoyo mutuo.

Finalmente agradezco al rastro frigorífico “Los Arcos” por la donación de ovarios, material esencial para este proyecto.

---

---

## DEDICATORIAS

Con toda mi admiración y amor a mi madre. Por ser la persona que siempre ha estado conmigo en cada etapa de mi vida. Por motivarme para seguir adelante ante cualquier adversidad. Por su amor y dedicación hacia mí. Sin duda tengo la gran dicha de ser su hija, jamás podré pagar todo lo que ha hecho por mí. Espero llenarla de orgullo siempre.

Con cariño y gran agradecimiento a mi padre. Por todo el trabajo y esfuerzo para darme lo que necesité y poder continuar con mis metas. Por darme ánimos y siempre estar orgulloso de mí. Siempre valoraré todo lo que me ha dado.

A mis hermanos, Raquel, Alexandra y David. Por todo su apoyo. Por todos los momentos juntos, con sus risas hacen divertido cada día.

A mis sobrinos. Por ser las personitas que me hacen sentir niña de nuevo. Por darme felicidad. Siempre tratare de guiarlos. Los quiero mucho.

A mi abuelita, Josefina. Por estar presente en mi vida. Por sus consejos y cariño.

A cada miembro de mi familia; tíos, primos y cuñados. Por todos los momentos que alguna vez hemos compartido. Por las muestras de apoyo.

A mi "chiqui". Por su gran amor y motivación para seguir adelante, eres muy importante en mi vida, quiero crecer a tu lado y triunfar juntos siempre.

---

---

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

**Albert Einstein**

---

---

## Índice

<b>Resumen</b> .....	11
<b>1. Introducción</b> .....	13
1.1. Ovogénesis.....	14
1.2. Foliculogénesis .....	15
1.3. Maduración del ovocito .....	18
1.4. Fertilización.....	20
1.4.1. Reconocimiento y fusión entre ovocito y espermatozoide .....	20
1.4.2. Activación del ovocito .....	21
1.4.3. Formación de pronúcleos y singamia .....	22
1.5. Desarrollo embrionario.....	23
1.6. Toxicología .....	26
1.7. Toxicología reproductiva.....	26
1.7. Compuestos perfluorados.....	27
1.7.1. Ácido perfluorooctanoico .....	29
1.7.2. Exposición humana al PFOA.....	30
<b>2. Antecedentes</b> .....	31
2.1. Efectos de los CPFs en la reproducción .....	31
<b>3. Justificación</b> .....	34
<b>4. Pregunta de investigación</b> .....	35
<b>5. Objetivo general</b> .....	35
<b>6. Objetivos particulares</b> .....	35
<b>7. Hipótesis</b> .....	36
<b>8. Materiales y métodos</b> .....	37
8.1 Colecta de ovarios y de Complejos Ovocitos-Células del Cúmulo (COCs) 37	
8.2 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos (MIV).....	38
8.2.1. Evaluación de la viabilidad y la maduración .....	39
8.3 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) .....	41

---

---

8.3.2	Inseminación <i>in vitro</i> .....	41
8.3.3	Evaluación de la Fertilización <i>in vitro</i> .....	42
8.4	Cultivo embrionario <i>in vitro</i> .....	43
8.4.1	Evaluación de la viabilidad de embriones tempranos.....	45
<b>9.</b>	<b>Diseño experimental</b> .....	<b>46</b>
9.1.	Tratamiento con PFOA .....	46
<b>10.</b>	<b>Análisis Estadístico</b> .....	<b>47</b>
<b>11.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>48</b>
11.1.	<b>Efecto del PFOA en la viabilidad de embriones expuestos durante 144 h</b> .....	<b>48</b>
11.2.	<b>Efecto del PFOA sobre el desarrollo embrionario total a las 144 h de cultivo <i>in vitro</i>.</b> .....	<b>50</b>
11.3.	<b>Efecto del PFOA sobre estadios embrionarios en 2- 8 células a las 144 h de desarrollo.</b> .....	<b>52</b>
11.4.	<b>Efecto del PFOA sobre el estadio de mórula a las 144 h de desarrollo.</b> .....	<b>54</b>
11.5.	<b>Efecto del PFOA sobre la obtención de embriones en la etapa de blastocisto las 144 h de desarrollo.</b> .....	<b>56</b>
<b>12.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>57</b>
12.1.	<b>Efecto del PFOA en la viabilidad de embriones expuestos durante 144 horas.</b> .....	<b>58</b>
12.2.	<b>Efecto del PFOA sobre el DE <i>in vitro</i> durante 144 horas.</b> .....	<b>60</b>
<b>13.</b>	<b>Conclusión</b> .....	<b>63</b>
<b>14.</b>	<b>Perspectivas</b> .....	<b>64</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>65</b>
<b>16.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>73</b>
16.1.	Medios de Cultivo .....	73
16.2.	Tratamiento con PFOA .....	77

---

---

## Resumen

Los compuestos perfluorados (CPF) son considerados xenobióticos, agentes químicos sintéticos, físicos y biológicos no producidos de manera natural en los organismos y que al ser ampliamente utilizados en la industria, tienen una gran persistencia en el ambiente y un elevado tiempo de retención en tejidos biológicos. Diversos estudios toxicológicos se han centrado en analizar los posibles efectos de los CPFs sobre varios aspectos de la salud, entre ellos los procesos reproductivos (maduración de gametos, foliculogénesis, fertilización y desarrollo embrionario), sin embargo, sus mecanismos de acción no han sido caracterizados. *In vivo* se ha reportado su participación en la disminución de las tasas de desarrollo embrionario, sin embargo, no existen estudios *in vitro* que lo demuestren. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del ácido perfluorooctanoico (PFOA) sobre la viabilidad y el desarrollo embrionario (DE) temprano *in vitro*, utilizando el modelo porcino. Los embriones se produjeron *in vitro* a partir de ovocitos inmaduros obtenidos en rastro, los cuales se maduraron, fertilizaron y desarrollaron *in vitro*. Para determinar el efecto del PFOA se usaron diferentes concentraciones (0, 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ) durante 144 h de desarrollo embrionario. Se determinó que la concentración letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) para los embriones fue de 146  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos indican que el PFOA tuvo efecto sobre la viabilidad de los embriones en las concentraciones de 100 y 150  $\mu\text{M}$  con respecto al grupo control. En cuanto a la evaluación del desarrollo embrionario, los resultados indican que en la etapa embrionaria en 2 a 8 células, el PFOA no afectó el desarrollo en ninguno de los tratamientos, sin embargo, disminuyó el desarrollo en las etapas de mórulas y blastocistos en todas las concentraciones utilizadas (50, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ). Por lo tanto se plantea que el efecto negativo del PFOA puede deberse al daño producido en el ADN, apoptosis, especies reactivas de oxígeno (EROS), alteración en la funcionalidad de Cadherina-E, homeostasis de Calcio y en uniones comunicantes, que en conjunto pueden alterar la producción de mórulas y blastocistos.

---

---

## Abstract

Perfluorinated compounds (PFs) are considered as xenobiotics synthetic, physical and biological chemical agents which are not expected to be present inside the organisms and neither to be synthesized by them. They are widely used in industry, they have a high persistence in the environment and a high retention time in biological tissues. Several toxicological studies have focused on analyzing the possible effects of PFs on various health aspects, including reproductive processes (gamete maturation, folliculogenesis, fertilization and embryo development), however, their mechanisms of action have not been characterized. In vivo, its participation in the reduction of embryonic development rates has been reported, however, there are no in vitro studies demonstrating this effect. The objective of this study was to determine the effect of perfluorooctanoic acid (PFOA) on viability and early embryo development in vitro, using the porcine model. Porcine embryos were produced in vitro from immature oocytes obtained from the slaughterhouse, then matured, fertilized and developed in vitro. To determine the effect of PFOA, different concentrations (0, 50, 100 and 150  $\mu\text{M}$ ) were used during 144 h of embryo development. It was determined that lethal concentration 50 ( $\text{LC}_{50}$ ) for the embryos was 146  $\mu\text{M}$ . The results obtained indicate that PFOA had an effect on the viability of embryos at concentrations of 100 and 150  $\mu\text{M}$  with respect to the control group. Regarding the evaluation of the embryo development, the results indicate that in the embryo stages from 2 to 8 cells, the PFOA does not show effect in any of the treatments, however, the effect was appreciated in the morula and blastocysts stages in all concentrations used (50, 100 and 150  $\mu\text{M}$ ). Therefore, it is suggested that the negative effect of PFOA may be due to damage to the DNA, apoptosis, reactive oxygen species (ROS), alteration in the functionality of Cadherin-E, calcium homeostasis and in communicating connections, which together can alter the production of morulas and blastocysts.

---

---

## 1. Introducción

La sociedad actual se encuentra altamente industrializada, lo que implica que la fabricación masiva de productos, libere al medio ambiente una gran variedad de compuestos químicos que pueden tener efectos tóxicos y con ello representan un factor de riesgo para la salud en la población (Peropadre, 2014).

Entre los efectos tóxicos de los contaminantes se pueden incluir alteraciones en los procesos de reproducción que pueden desencadenar infertilidad, que es un problema que afecta al 15 % de las parejas en edad reproductiva y es provocada por diversos factores, entre los que se encuentra el incremento en la producción y exposición al medio ambiente de compuestos químicos (Karwacka *et al.*, 2017).

Los CPFs pueden ser considerados como agentes xenobióticos (sustancias dañinas al ambiente que no existen de manera natural, son principalmente introducidas por actividades humanas), además al ser ampliamente utilizados en la industria, tienen una gran persistencia en el ambiente y un elevado tiempo de retención en tejidos biológicos (Bonilla *et al.*, 2001). Diversos estudios toxicológicos (Governini *et al.*, 2011; Chaparro-Ortega *et al.*, 2018; Domínguez *et al.*, 2019) se han centrado en analizar los posibles efectos de los CPFs sobre varios aspectos de la salud, entre ellos los procesos reproductivos (maduración de gametos, foliculogénesis, fertilización y el DE), sin embargo, sus mecanismos de acción no han sido caracterizados.

---

---

## 1.1. Ovogénesis

En los mamíferos, los ovocitos se originan durante el DE a partir de células germinales primordiales (CGP) las cuales derivan del epiblasto (capa externa del blastocisto), posteriormente, migran hacia el endodermo del saco vitelino, en los humanos esto sucede aproximadamente durante la cuarta semana de gestación. Después migran hacia el primordio gonadal que dará origen al ovario, las CGP son indispensables para la inducción del desarrollo gonadal. Una vez establecidas en el ovario primordial, las CGP son transformadas en ovogonias, las cuales comienzan a dividirse por sucesivas mitosis durante la séptima semana de gestación, y posteriormente originan a los ovocitos primarios en los cuales se iniciará la meiosis (Yen y Jaffes, 2009).

Toda la población de ovocitos que la hembra producirá entra en meiosis durante la etapa fetal. La división meiótica abarca dos ciclos sucesivos; Meiosis I y Meiosis II, cada una con cuatro fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase. Durante la primera división meiótica los ovocitos primarios quedan detenidos en el estado de diplóteno de la Profase I, con su núcleo prominente, conocido como vesícula germinal (VG). En este estado, la maduración se encuentra inhibida por un sistema de control entre las uniones comunicantes presentes entre las células de la granulosa y el ovocito, las cuales son responsables de esta detención meiótica a través de la producción y liberación de moléculas específicas tales como el AMPc (Betancourt *et al.*, 2003).

---

---

## 1.2. Foliculogénesis

Los folículos ováricos son las unidades morfofisiológicas fundamentales de los ovarios, ya que representan el principal compartimento endocrino y reproductivo de este órgano. La foliculogénesis consiste en una sucesión de cambios celulares necesarios para la maduración de los folículos (Rajkovic *et al.*, 2006).

La formación del folículo ocurre durante la vida fetal, donde el ovocito es indispensable para la formación folicular ya que secreta factores de transcripción que realizan cambios en la expresión génica del ovario para el reclutamiento de células ováricas que darán origen a un folículo primordial, el cual está formado por un ovocito inmaduro en la fase de diplóteno de la Profase I y por una capa de células aplanadas denominadas pregranulosas (Zuccotti *et al.*, 2011). La mayoría de los folículos permanecen inactivos y solo un pequeño número de éstos se recluta en el grupo folicular creciente y es el que contribuirá a la fertilidad femenina (Zhang y Liu, 2015). En algunas especies el desarrollo folicular es largo y resulta en la ovulación de uno o más ovocitos con capacidad de ser fertilizados y lograr el DE. En el porcino son reclutados alrededor de 50 folículos de los cuales de 12 a 20 serán ovulados (Paradis *et al.*, 2009).

El inicio del crecimiento folicular se caracteriza por cambios morfológicos, que incluyen un cambio en la forma de las células de la granulosa de aplanadas hacia cuboides, conformando un folículo primario el cual se caracteriza por el crecimiento del ovocito y por un incremento en la proliferación de células de la granulosa, además durante esta fase se inicia la formación de la zona pelúcida (ZP) que rodea al ovocito (Yen y Jaffes, 2009).

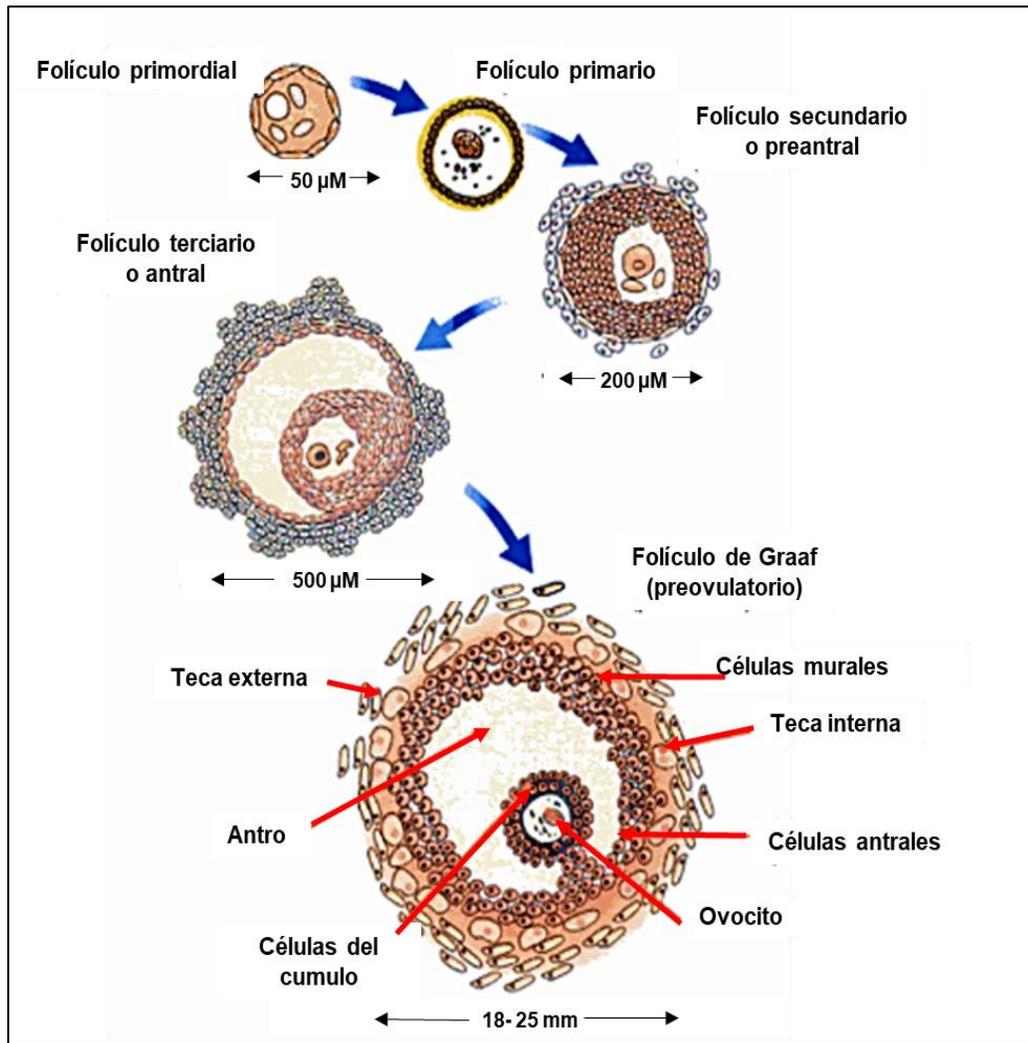
A medida que las células de la granulosa se incrementan en número, van desarrollando receptores para hormonas foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH), estrógenos y andrógenos. Esta etapa se conoce como folículo secundario y

---

---

en el ocurre la formación de las células de la teca interna y externa, las cuales se forman a medida que el folículo se expande y comprime el estroma del ovario. Simultáneamente las células de la teca desarrollan receptores a la LH y la capacidad de sintetizar hormonas esteroideas. Los folículos secundarios constituyen el conjunto de folículos preantrales a partir de los cuales ocurre el reclutamiento de folículos dependientes de la FSH (Yen y Jaffes, 2009).

Finalmente, la etapa antral o folículo terciario depende de la acción de FSH y LH, las cuales son sintetizadas en la adenohipófisis y su secreción en el torrente sanguíneo es regulado por acción de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH) al inicio de la pubertad, para el desarrollo y función del folículo. El folículo terciario se caracteriza por la aparición de una cavidad llena de líquido, denominada cavidad antral, que comienza a formarse cuando los folículos están rodeados de alrededor de seis capas de células de la granulosa. La formación de la cavidad antral marca la separación morfológica y funcional de las células de la granulosa en: células murales que recubren la pared del folículo, las células antrales que rodean la cavidad antral y las células del cúmulo (CC) que rodean al ovocito (Figura 1). Tanto las células murales como las antrales tienen actividad esteroideogénica. El antro contiene fluido folicular el cual representa un microambiente rico en moléculas nutricionales (proteínas, enzimas, aminoácidos, compuestos energéticos) y moléculas reguladoras tales como las hormonas y electrolitos (Zuccotti *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Componentes celulares del folículo y representación de las diferentes etapas de la Foliculogénesis. Se observa un incremento de tamaño desde el folículo primordial hasta el folículo de Graaf (Tomado y modificado de Urbina y Lerner Biber, 2008).

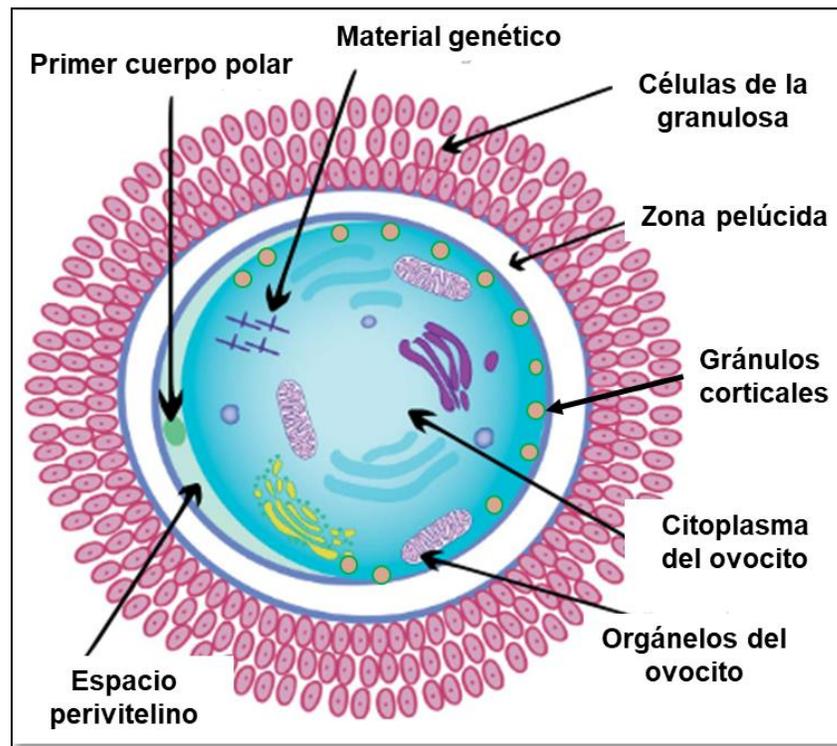
---

---

### 1.3. Maduración del ovocito

Al llegar a la pubertad, como consecuencia de una oleada de FSH y LH, que actúan sobre el folículo terciario, se reinicia la maduración nuclear del ovocito. Las hormonas gonadotropinas activan la vía de señalización que produce la pérdida de las uniones comunicantes entre el ovocito y las CC por lo que las concentraciones de AMPc disminuyen, permitiendo la reanudación de la primera división meiótica hasta la Metafase I (MI). Al término de esta división ocurre la expulsión del primer cuerpo polar y se inicia la segunda división meiótica hasta la metafase II (MII), en este estado, la meiosis se detiene nuevamente y sólo culminará si ocurre la fertilización (Hafez, 2002).

Para que la fertilización progrese hacia el DE, el ovocito requiere haber madurado tanto nuclear como citoplásmicamente. La maduración citoplásmica consiste en la reorganización de orgánulos (Figura 2), proceso que es de vital importancia para la fertilización y el éxito del DE. Durante la maduración, las mitocondrias se distribuyen de manera uniforme para garantizar la sobrevivencia del embrión y los gránulos corticales aumentan en número y se distribuyen en la periferia del ovocito debajo de la membrana plasmática, para bloquear la entrada de espermatozoides adicionales después de la fertilización. Además se realiza un almacenamiento de ARNm, proteínas, lípidos y factores de transcripción necesarios para la fertilización y la embriogénesis temprana (Reader *et al.*, 2017).



**Figura 2.** Ovocito madurado, se muestran los componentes celulares y su ubicación en él (Tomado y modificado de Carrillo *et al.*, 2014).

---

---

## 1.4. Fertilización

La fertilización es un proceso en el cual ocurre la interacción entre el ovocito y el espermatozoide, mediante el reconocimiento y fusión de ambos gametos, concluyendo con la formación del cigoto.

### 1.4.1. Reconocimiento y fusión entre ovocito y espermatozoide

Los espermatozoides recién eyaculados son incapaces de fecundar al ovocito, es por ello que una vez depositados en el tracto reproductor femenino debe ocurrir la capacitación espermática. Este proceso consiste en una serie de cambios en el espermatozoide tales como; la fosforilación de proteínas, la eliminación de colesterol de la membrana plasmática, y la elevación de Calcio intracelular. Una vez capacitados, los espermatozoides demuestran un vigoroso patrón de movimiento flagelar llamado hiperactivación. La capacitación le permitirá a los espermatozoides realizar su recorrido por el tracto reproductor femenino hasta llegar al ovocito y poder fecundarlo (Okabe, 2013). En el cerdo, el espermatozoide necesita de 5 a 6 horas en el interior del tracto genital femenino para capacitarse y poder interactuar con el ovocito (Polge, 1978).

Los espermatozoides llegan a la parte ampular del oviducto por quimioatracción, para encontrarse con el ovocito. Solo los espermatozoides capacitados pueden atravesar la capa de CC y unirse a la ZP. Esta unión está mediada por la interacción entre moléculas con gran afinidad en ambos gametos, como la glicoproteína ZP3 de la ZP, la cual es reconocida por proteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide. Esta unión induce la reacción del acrosoma (orgánulo que se encuentra en la punta apical de la cabeza del espermatozoide contiene enzimas líticas como hialuronidasa, acrosina, tripsina entre otras). Durante la reacción acrosomal se fusiona la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa provocando la liberación del contenido acrosómico sobre la ZP. Esta liberación enzimática permite que el

---

---

espermatozoide atraviese la ZP para llegar al espacio perivitelino del ovocito, en donde se exteriorizan moléculas de unión, como IZUMO 1 en el espermatozoide y su receptor CD9 en el ovocito, lo cual permite la fusión de las membranas plasmáticas de ambos gametos (Okabe, 2013).

#### 1.4.2. Activación del ovocito

La fusión de membranas entre ambos gametos desencadena la activación del ovocito mediante una cascada de señales celulares (Yanagimachi, 1994). Una vez que el espermatozoide entra en el ovocito ocurre una rápida liberación de Calcio intracelular de las reservas internas, provocado por la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) desencadenando la liberación de fosfatidil inositol 3 fosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> se une a receptores presentes en el retículo endoplásmico y estimula la liberación de Calcio, la cual puede persistir durante 3 o 4 horas (Martin *et al.*, 2017).

El incremento intracelular de Calcio induce la reacción de gránulos corticales en el ovocito, la cual consiste en la liberación de enzimas, que alteran la conformación de la ZP. Esta alteración disminuye la afinidad de los espermatozoides con el ovocito, bloqueando la entrada de espermatozoides adicionales, evitando la polispermia (Okabe, 2013). Durante la activación del ovocito, también ocurre una serie de vías de señalización que permiten la culminación de la segunda división meiótica en el ovocito y la expulsión del segundo cuerpo polar (Martin *et al.*, 2017).

---

---

### 1.4.3. Formación de pronúcleos y singamia

Después de la activación del ovocito, se produce la formación de los pronúcleos (PN) femenino y masculino. En este proceso, el espermatozoide pierde la membrana nuclear, lo que provoca que su cromatina quede expuesta en el citoplasma del ovocito.

Esta cromatina entra en un proceso de descondensación, en donde los puentes disulfuro de las protaminas del espermatozoide son reducidos. Esta descondensación es producida por el glutatión reducido presente en el citoplasma del ovocito (Yanagimachi, 1994). En seguida ocurre el cambio de protaminas (proteínas para el empaquetamiento de material genético del espermatozoide) por histonas y se forma una nueva envoltura nuclear, dando origen al PN masculino. Por su parte una vez concluida la meiosis, en el ovocito también ocurre el proceso de descondensación, se forma la membrana nuclear y queda conformado el PN femenino (Martin *et al.*, 2017).

Después de la formación de ambos PN, sus membranas nucleares son desintegradas y ocurre la unión entre ellos, proceso conocido como singamia, lo cual marca el final de la fecundación y el principio del DE. En los mamíferos este proceso dura aproximadamente 12 horas (Yanagimachi, 1994).

---

---

## 1.5. Desarrollo embrionario

El DE inicia a partir de la formación del cigoto, en donde ocurren una serie de divisiones celulares y cambios tanto morfológicos como funcionales (Gilbert, 2005).

Las primeras divisiones se conocen como segmentación. Es durante este periodo del desarrollo que ocurren cambios en la cromatina del embrión ya que inicialmente se encuentra silenciado. En el cerdo el genoma embrionario se activa en la etapa de 3 a 4 blastómeros, esta activación es importante para desencadenar cambios en el embrión. Entre los cambios estructurales y funcionales que ocurren en los blastómeros, se encuentra el incremento de adhesión celular entre los blastómeros y la distribución de componentes membranales y citoplasmáticos. Uno de los cambios morfológicos asociados con la activación del genoma embrionario es la formación de nucléolos con ARN ribosomal (ARNr) y enzimas necesarias para la transcripción (Oestrup *et al.*, 2009).

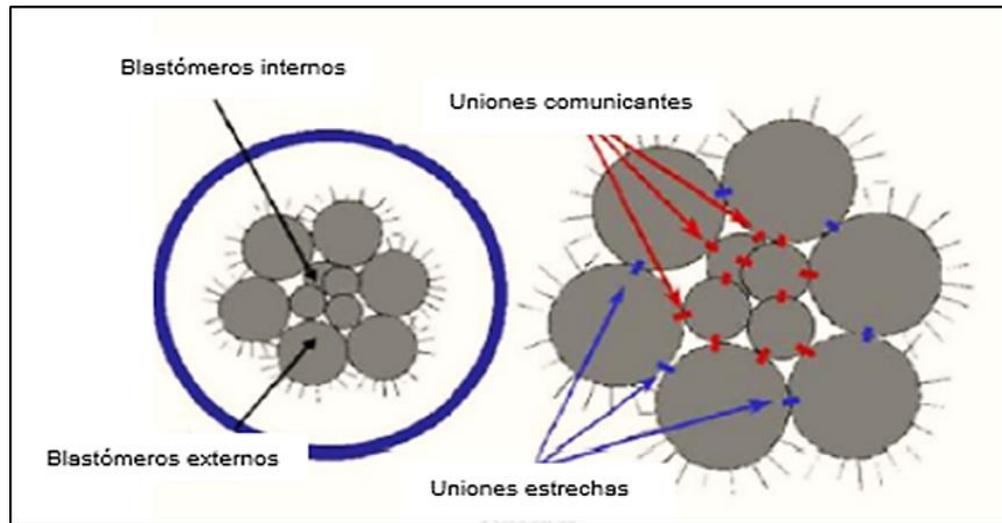
La adhesión intercelular aumenta en los blastómeros debido a la relocalización de los complejos de cadherina-catenina. Estos cambios favorecen una unión más estrecha entre los blastómeros, proceso conocido como la compactación embrionaria, la cual dará lugar a la formación de la mórula, en donde los blastómeros se agrupan zonalmente diferenciándose en blastómeros externos o polares y blastómeros internos no polares (Trejo *et al.*, 2008).

Los blastómeros externos tienen uniones estrechas, este tipo de uniones además de reducir el espacio intercelular, impide la difusión de lípidos y proteínas entre los dominios de la membrana plasmática contribuyendo a la polaridad celular. Los blastómeros internos tienen uniones comunicantes que son muy importantes ya que mantienen la comunicación intercelular permitiendo el paso de moléculas específicas y necesarias para su desarrollo como el AMPc y el Calcio (Figura 3).

---

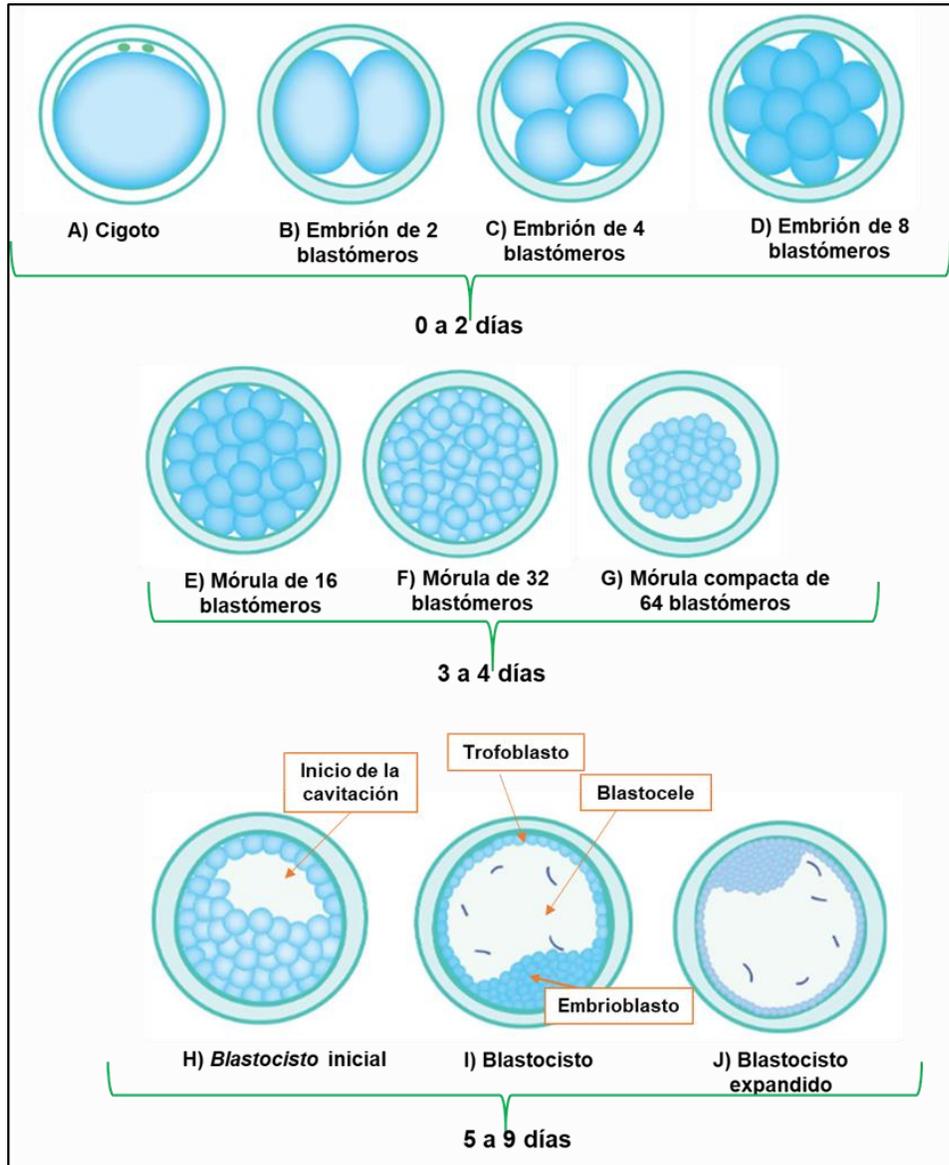
---

Después la mórula continúa su desarrollo, donde sus blastómeros externos e internos continuarán su diferenciación y crecimiento (Trejo *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Tipos de unión entre los blastómeros. Las flechas negras indican la diferenciación de blastómeros. Las flechas rojas y azules indican los tipos de unión. (Tomado de Trejo *et al.*, 2008).

Aproximadamente en la etapa de 32 blastómeros o mórula, ocurre una diferenciación, los blastómeros externos se han especializado en el linaje celular conocido como trofoectodermo y forman un epitelio funcional. Los blastómeros internos dan origen a la masa celular interna. La presencia del  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y de acuaporinas en el trofoectodermo asegura la canalización de iones y agua, lo que permite la formación de una cavidad llena de líquido conocida como blastocele. Tras la formación de esta cavidad, al embrión se le conoce como blastocisto, el cuál es el estadio de implantación en el útero (Figura 4) (Artus y Chazaud, 2014).



**Figura 4.** El DE temprano inicia con un cigoto, posterior a esta etapa ocurren divisiones celulares que dan origen a las diferentes etapas embrionarias (2 a 8 células, mórula y blastocisto) (Tomado y modificado de Carrillo *et al.*, 2014).

---

---

El proceso del DE, es muy susceptible a daños por tóxicos ambientales los cuales se han relacionado con el incremento de estrés oxidativo, el daño al ADN y las modificaciones epigenéticas, lo cual repercute en el éxito del DE (Guo *et al.*, 2017).

## 1.6. Toxicología

La palabra toxicología, es definida como el estudio de los venenos, es descrita como la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados con la exposición a agentes físicos o químicos (Repetto, 1997). El término exposición, se refiere a concentraciones o cantidades de una sustancia que está en contacto con individuos o poblaciones. La toxicología ha sido muy útil en la investigación sobre los mecanismos de acción de agentes tóxicos (Silbergeld, 2001).

## 1.7. Toxicología reproductiva

La toxicología reproductiva es la rama de la toxicología que estudia el efecto de los xenobióticos sobre la fertilidad de los organismos y su DE. Las alteraciones en la fertilidad incluyen efectos sobre la actividad hormonal, comportamiento sexual, espermatogénesis, ovogénesis, fertilización, y DE hasta la etapa de implantación (Repetto, 1997).

---

---

## 1.7. Compuestos perfluorados

Los CPFs son considerados como xenobióticos y constituyen un grupo de compuestos químicos que se caracterizan por tener una estructura fluorocarbonada hidrofóbica y una cabeza polar hidrofílica, unidos por enlaces covalentes (Li *et al.*, 2017).

El grupo de los CPFs se divide en dos categorías: Los Perfluoroalquil-sulfonatos, que incluyen el ácido perfluorohexano sulfónico (PFHxS) y el ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS). Y los Perfluoroalquil-carboxilatos, que a su vez incluyen al ácido perfluorooctanoico (PFOA) y el ácido perfluorodecanoico (PFDA).

Los CPFs son altamente resistentes a la degradación microbiana, fotólisis e hidrólisis (Gorrochategui *et al.*, 2014). Debido a que poseen propiedades de repeler el agua y el aceite, además de presentar resistencia a la degradación, han sido utilizados en la industria como surfactantes y emulsionantes desde el año 1950 en la fabricación de envases de alimentos, espumas contra incendios, pinturas, antiadherentes, ropa de montaña y en ciertos productos de limpieza personal como en shampoo, pasta de dientes y maquillaje (Governini *et al.*, 2015). El amplio uso de estos compuestos y su liberación al medio ambiente han provocado que se acumulen en el aire, agua y sedimento por lo que los seres vivos se encuentran expuestos a estos tóxicos.

La exposición a CPFs se ha relacionado con diversas patologías; por ejemplo en un estudio realizado en muestras de suero sanguíneo de trabajadores de la planta DuPont en Virginia Occidental (EUA), se reportó una concentración de 350 ng/mL, en los trabajadores ocupacionalmente expuestos, y se asoció con un incremento en el desarrollo de enfermedades como diabetes mellitus y enfermedades renales crónicas (Steenland y Woskie, 2012). Además se ha demostrado que los CPFs presentan afinidad a proteínas plasmáticas tales como la

---

---

albúmina lo que permite su distribución por el organismo y favorece la bioacumulación en ciertos órganos como en pulmones, hígado y riñones (Chen *et al.*, 2017).

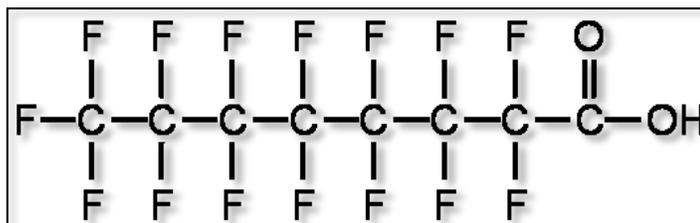
Dentro del grupo de los CPFs se ha observado que el PFOA, es uno de los perfluorados altamente persistentes en el ambiente y en los organismos (Chai *et al.*, 2017) y se les encuentra en distintos organismos dentro de las cadenas alimenticias. Es así que se ha reportado su presencia en suero humano y en otras especies como *Panthera tigris*, delfines nariz de botella (*Tursuops truncatus*), tortugas como *Caretta caretta* y *Lepidochelys remiim*, águilas calvas, gaviotas noruegas (*Larus argentatus*) y en peces como la trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*) (Gebbinck *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011).

---

---

### 1.7.1. Ácido perfluorooctanoico

El PFOA es particularmente utilizado en la elaboración de productos industriales como alfombras, envases de alimentos, ropa, en el teflón de utensilios de cocina, y en la industria electrónica (Wu *et al.*, 2012). Es un compuesto perfluorado, estructurado por una cadena de ocho átomos de carbono unidos a átomos de flúor por enlaces covalentes y presenta un grupo carboxilo (Figura 5). En los vertebrados, las rutas comunes de exposición a este compuesto son: la respiratoria, digestiva y cutánea (Ngo *et al.*, 2014). Una vez dentro del organismo el PFOA se almacena principalmente en el hígado y en riñones ya que no es metabolizado y se estima que su vida media en el organismo es de 3-8 años (Fei *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2017).



**Figura 5.** Estructura química del PFOA, se muestra la cadena de carbonos (hidrofóbica) y la cabeza con un grupo carboxilo (hidrofílica).

---

---

### 1.7.2. Exposición humana al PFOA

Se ha demostrado que todos los seres vivos podemos estar expuestos al PFOA a través del agua, y se han reportado concentraciones de 500 a 640 ng/L en agua potable (Hölzer *et al.*, 2008).

El PFOA ha sido detectado en el plasma sanguíneo humano en personas de varias partes del mundo. En la población en general el PFOA se ha detectado a una concentración de 4 ng/mL, mientras que en la población ocupacionalmente expuesta la concentración ha sido de 350 ng/mL en plasma sanguíneo (Krafft y Riess, 2015). Sin embargo, la concentración más alta de PFOA reportada en suero de trabajadores ocupacionalmente expuestos es de 276  $\mu$ M (Slotkin *et al.*, 2008).

La exposición al PFOA en recién nacidos es a través de la leche materna, se han reportado concentraciones que oscilan entre 10 y 211 ng/L, lo que puede afectar las funciones de la leche sobre el desarrollo postnatal (Motas Guzmàn *et al.*, 2016).

---

---

## 2. Antecedentes

### 2.1. Efectos de los CPFs en la reproducción

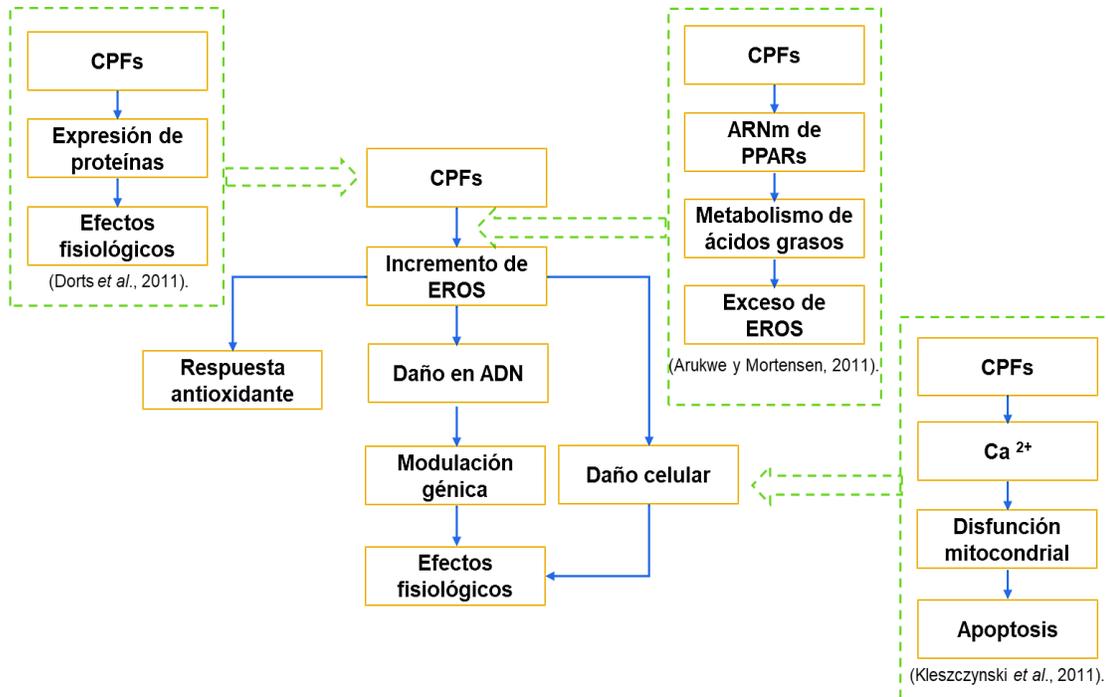
La presencia de los CPFs ha sido reportada en fluidos humanos tales como, en el suero sanguíneo, fluido folicular, leche materna y también en tejidos como en cordón umbilical y la placenta (Stein *et al.*, 2014).

En la literatura se ha relacionado la exposición a CPFs con una disminución de la fertilidad (1.66 ng/mL en sangre) (Vélez *et al.*, 2015). Se ha reportado que pueden alterar de manera negativa acortando el ciclo menstrual y con ello disminuir las probabilidades de lograr la gestación (Fei *et al.*, 2009; Bach *et al.*, 2015; Lum *et al.*, 2017). En mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida, la presencia de una mezcla de CPFs 13 ng/mL (0.026  $\mu$ M) en el fluido folicular se asoció con una disminución en los porcentajes de fertilización y de transferencia embrionaria (Governini *et al.*, 2011).

Los CPFs además pueden atravesar la barrera placentaria durante el desarrollo fetal, propiciando abortos espontáneos y mortalidad neonatal (Maisonet *et al.*, 2012; Darrow *et al.*, 2014). El mecanismo propuesto por el cual estos compuestos atraviesan la barrera placentaria es regulado por la expresión de proteínas transportadoras de aniones orgánicos (OAT), se sugiere que OAT4, regula la absorción del PFOS y PFOA, ya que además de estar presente en la placenta también se encuentra en los riñones, provocando que se excreten niveles muy bajos de estos compuestos en la orina (Kummu *et al.*, 2015).

La exposición prenatal también es asociada con alteraciones en el desarrollo tales como disminución de peso y talla al nacer (Fei *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2008; Maisonet *et al.*, 2012). Estudios realizados en ratas preñadas expuestas al PFOA, indicaron que hay efectos negativos en los recién nacidos, ya que presentaron hipertrofia del hígado y reducción de peso (Yahia *et al.*, 2010).

Debido a la relación de los CPFs sobre diferentes eventos fisiológicos y de acuerdo a lo reportado en estudios, se han planteado posibles vías de acción de los CPFs con lo cual desencadenarían diversos efectos toxicológicos en el organismo (Figura 6) (Liu *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Posibles vías de los CPFs, que desencadenan efectos toxicológicos en el organismo (Tomado y modificado de Liu *et al.*, 2014).

---

---

En el laboratorio de Biología Celular de la UAM-I se han realizado estudios *in vitro* en el modelo porcino, para determinar el efecto de los CPFs en la maduración y viabilidad de ovocitos, esteroidogénesis y fertilización. Se ha reportado que el PFOS (10  $\mu\text{M}$ ) inhibió la función de las uniones comunicantes de ovocitos en VG afectando la viabilidad y la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos (Domínguez *et al.*, 2016). En un estudio se realizó la exposición al PFOS durante la MIV para determinar su posible repercusión sobre la fertilización *in vitro* (FIV) y el DE *in vitro*, demostrando que PFOS inhibió la MIV (9  $\mu\text{M}$ ) y disminuyó la viabilidad (31  $\mu\text{M}$ ), sin embargo, la FIV y el DE no resultaron afectados (Salomón, 2015). Asimismo se mostró que tanto el PFOA como el PFOS tuvieron un efecto como disruptores endocrinos sobre las células ováricas esteroidogénicas, ya que inhibieron la secreción de hormonas esteroides en células de la granulosa y de la teca, lo que podría repercutir con procesos que son dependientes de estas hormonas, como la maduración de los ovocitos y por lo tanto, afectar la fertilidad (Chaparro-Ortega *et al.*, 2018). Recientemente se ha demostrado el efecto del PFOA (76  $\mu\text{M}$ ) inhibiendo la MIV y disminuyendo la viabilidad de ovocitos (280  $\mu\text{M}$ ) (Teteltitla, 2018).

---

---

### 3. Justificación

Los CPFs, han sido asociados con varias alteraciones en la salud reproductiva. Uno de los CPFs más persistentes tanto en el ambiente como en seres vivos es el PFOA.

El DE temprano es un proceso de gran importancia para la reproducción por lo que necesita de un adecuado medio para el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia del embrión, por lo que la exposición a ciertos tóxicos durante esta etapa puede presentar un factor de riesgo para que ocurra un desarrollo embrionario exitoso. Hay estudios que indican que el PFOA afecta la MIV y la viabilidad de los ovocitos. Por lo tanto, es importante determinar si el PFOA puede afectar el DE temprano *in vitro*, ya que permitiría aportar información sobre la relación entre los CPFs y la disminución de la fertilidad femenina.

Los modelos *in vitro* han sido de gran utilidad en los estudios de toxicología reproductiva para el análisis de los posibles mecanismos de acción de los xenobióticos sobre algún proceso fisiológico determinado. El modelo porcino es adecuado ya que presenta similitudes fisiológicas, bioquímicas y endócrinas similares a las del humano (Gil *et al.*, 2010).

---

---

#### **4. Pregunta de investigación**

- ¿Qué efecto tendrá el PFOA sobre el DE temprano?

#### **5. Objetivo general**

- Evaluar el efecto del PFOA en el DE temprano *in vitro*.

#### **6. Objetivos particulares**

- Evaluar si el PFOA altera la viabilidad de los embriones expuestos a diferentes concentraciones durante su cultivo *in vitro*.
- Evaluar la viabilidad de los embriones expuestos a diferentes concentraciones de PFOA para determinar la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>).
- Evaluar si el PFOA altera el desarrollo de los embriones expuestos a diferentes concentraciones durante el cultivo embrionario.

---

---

## 7. Hipótesis

Si la exposición al PFOA es capaz de afectar la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos, entonces administrado en el cultivo embrionario, afectará el DE temprano *in vitro*.

---

---

## 8. Materiales y métodos

A menos de que se especifique lo contrario, los reactivos fueron de la marca SIGMA y todas las incubaciones se realizaron en una atmósfera a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación.

### 8.1 Colecta de ovarios y de Complejos Ovocitos-Células del Cúmulo (COCs)

Los ovarios se colectaron de cerdas prepúberes recién sacrificadas en el rastro (los Arcos, los Reyes, Edo. de México) y fueron transportados al laboratorio en un tiempo no mayor a 2 horas, en solución salina (NaCl al 0.9 %) a una temperatura de 25 °C, y a un pH de 7.3-7.4. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron tres veces con la misma solución.

Para la obtención del fluido folicular conteniendo los COCs, solo se puncionaron aquellos folículos que tuvieran un diámetro de 3 a 6 mm; la punción se hizo utilizando una jeringa desechable de 10 mL y una aguja de calibre 18. Una vez obtenido el fluido folicular, este se depositó en un tubo de 50 mL y se dejó sedimentar durante 20 minutos para favorecer la formación del paquete celular. El sobrenadante se desechó y al paquete celular se le agregaron 15 mL de Medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio, HEPES (2.38 g/L) y PVA (0.29 g/L) (TL-HEPES-PVA) a un pH de 7.3-7.4, nuevamente se dejó sedimentar durante 20 minutos; este procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente el paquete celular se colocó en una caja Petri de 90 mm de diámetro y se le agregaron 10 mL de TL-HEPES.

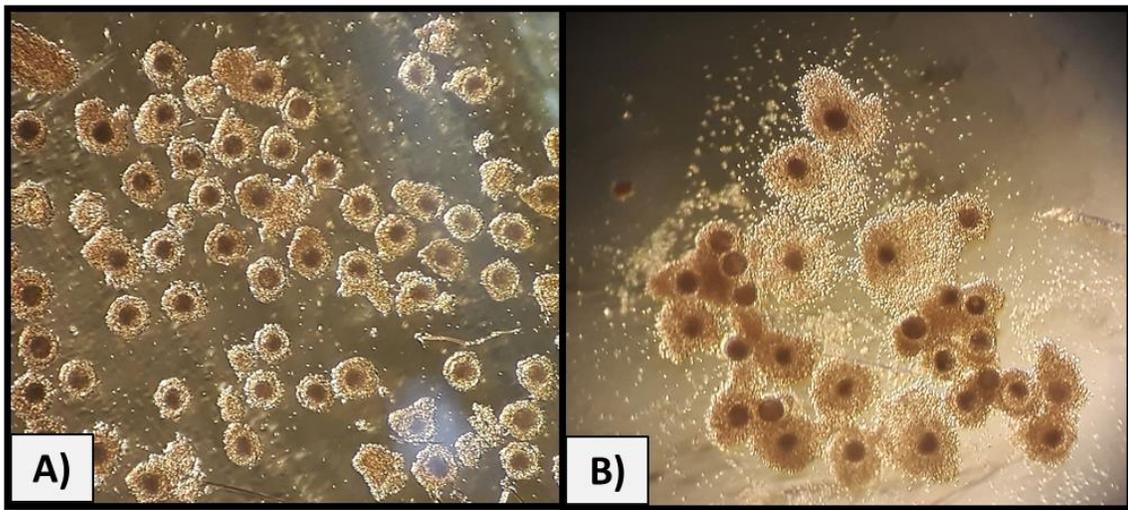
Utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61, Olympus, Philipines) se aspiraron los COCs con una pipeta Pasteur de vidrio estéril, adelgazada de forma manual. Solo se seleccionaron aquellos COCs constituidos por ovocitos con citoplasma uniforme, granular y rodeados por más de tres capas de CC.

---

---

## 8.2 Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)

Los COCs seleccionados se lavaron en 3 gotas de 500  $\mu$ L de medio de maduración TCM-199 suplementado con cisteína (0.57 Mm) y factor de crecimiento epidérmico (FCE) (10 ng/mL). Posteriormente, en una caja estéril de 4 pozos (Nunc, USA) con gotas de 500  $\mu$ L de TCM-199 se depositaron 50 COCs por pozo, y se agregaron 5  $\mu$ L de hormonas FSH y LH (0.5  $\mu$ g/mL) en cada uno de los pozos. Los COCs fueron incubados durante 44 horas en las condiciones descritas anteriormente. Al término de este tiempo se observó la expansión de las CC como un indicador indirecto de maduración, utilizando un microscopio estereoscópico (Figura 7) (Olympus SZ61, Olympus, Philipines) (Ducolomb *et al.*, 2009).



**Figura 7.** Maduración de ovocitos *in vitro*. A) COCs antes de la MIV, las CC se encuentran compactas. B) COCs después de la MIV, se observa la expansión y proliferación de las CC.

---

---

### 8.2.1. Evaluación de la viabilidad y la maduración

Transcurridas las 44 horas de incubación, para evaluar la viabilidad y la maduración nuclear se realizó la técnica de doble tinción. Previamente, las CC fueron retiradas de los ovocitos y posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (0.5 mg/mL en PBS) y se incubaron durante 30 minutos, posteriormente utilizando microscopio estereoscópico se realizó la evaluación de la viabilidad de acuerdo a los siguientes parámetros (ovocito púrpura: vivo, ovocito incoloro: muerto) (Figura 8).



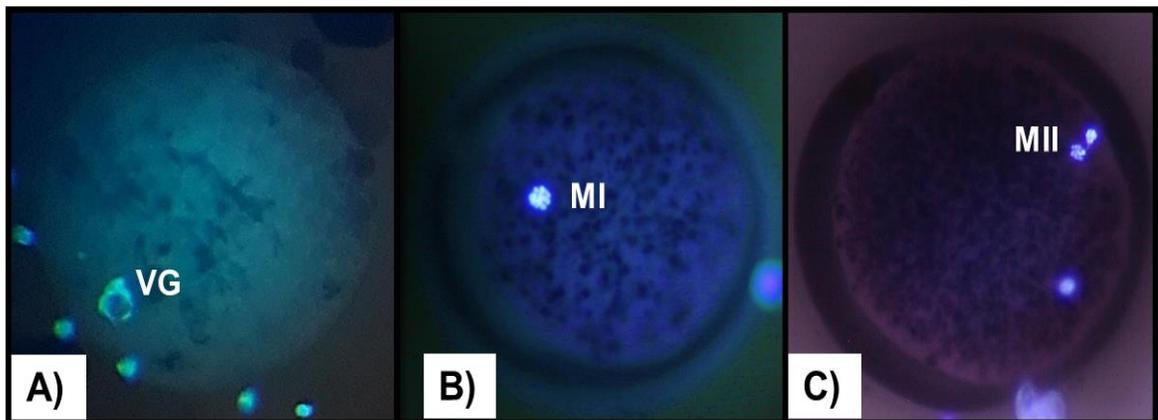
**Figura 8.** Ovocitos teñidos con MTT (incoloros: muertos púrpura: vivos). Observados con un microscopio estereoscópico a 40x.

Después de determinar la viabilidad se procedió a evaluar la maduración a través de la cromatina mediante tinción con Hoechst y microscopía de epifluorescencia (ZEISS, Axiostar Plus). Los ovocitos fueron lavados e incubados con 45  $\mu$ g/mL de Bisbenzamida (Hoechst 33258 en PBS) durante 45 minutos en refrigeración y aislados de la luz. Finalmente se fijaron con una solución de glutaraldehído al 0.5 % (glutaraldehído/PBS) durante 20 minutos, posteriormente se lavaron en PBS y se colocaron en un portaobjetos y se les agregó una gota de solución de montaje (Glicerol/PBS 9:1). Las etapas de maduración se evaluaron con

---

---

los siguientes criterios: ovocitos en Vesícula germinal (VG) se consideraron inmaduros, los ovocitos en Metafase I (MI) en vías de maduración y aquellos en Metafase II (MII) como ovocitos maduros (Figura 9), se observaron con microscopio de epifluorescencia a 460 nm de longitud de onda.



**Figura 9.** Ovocitos en distintas etapas de maduración; A) Vesícula germinal (VG) cromatina compacta. B) Metafase I (MI) cromatina descondensada. C) Metafase II (MII) cromatina descondensada y expulsión del cuerpo polar. Tinción con Hoechst. Observados con microscopía de epifluorescencia a 40x.

---

---

### 8.3 Fertilización *in vitro* (FIV)

Después de la MIV, se removieron las CC por acción mecánica. Los ovocitos se lavaron tres veces en medio de fertilización Tris Buffer Medium (TBM) suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) al 0.4% y 2.5 mM de benzoato de cafeína. Se colocaron 35 ovocitos en cajas de 4 pozos con 50  $\mu$ L de medio TBM suplementado con BSA y cubiertos con aceite mineral.

Para realizar la FIV, se utilizó una muestra de semen, obtenida mediante la técnica de mano enguantada, proveniente de una granja de inseminación porcina comercial. El semen fue transportado a una temperatura de 16 °C en un máximo de 2 horas.

De la muestra de semen se evaluó la motilidad. En un tubo de 15 mL se colocaron 5 mL de semen y 5 mL de Solución Amortiguadora de Fosfatos Dulbeco (DPBS) suplementado con 0.1 g/L  $\text{CaCl}_2$  anhidro, 100  $\mu$ g/ mL penicilina, 75  $\mu$ g/ mL estreptomina y 0.1% BSA a un pH de 7.2. Esta suspensión se centrifugó a 61 g durante 5 minutos, después se tomaron 5 mL del sobrenadante y se colocaron en un tubo de 15 mL con 5 mL de DPBS. Se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante quedando solo el paquete celular al cual se le agregaron 10 mL de DPBS se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se desechó el sobrenadante y el paquete celular se diluyó con 100  $\mu$ L de TBM. De esta suspensión se tomaron 10  $\mu$ L se realizó una dilución 1:1000 y se procedió a contar los espermatozoides en una cámara de Neubauer.

#### 8.3.2 Inseminación *in vitro*

En la caja de 4 pozos con 50  $\mu$ L de TBM y con 35 ovocitos, se agregaron 50  $\mu$ L de la dilución espermática por pozo a una concentración final de  $5 \times 10^5$  espermatozoides/mL y se coincubaron durante 6 horas.

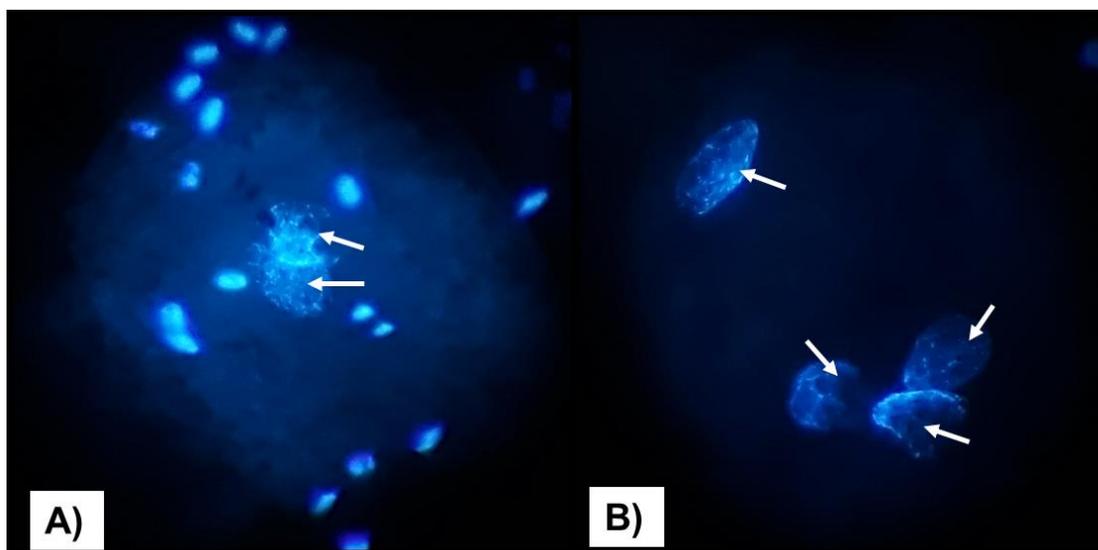
---

---

Transcurrida la coincubación, se realizaron los lavados de la siguiente manera: los cigotos se lavaron tres veces en gotas con 50  $\mu$ L de medio de desarrollo North Carolina State University-23 (NCSU-23) (Petters y Wells, 1993), suplementado con BSA al 0.4% a pH de 7.2- 7.4. Realizados los lavados, los cigotos se colocaron en cajas de 4 pozos con 500  $\mu$ L de NCSU-23 en las condiciones anteriormente mencionadas y se incubaron durante 12 horas para la evaluación de la fertilización.

### 8.3.3. Evaluación de la Fertilización *in vitro*

Para evaluar la viabilidad y la fertilización se utilizó la técnica de doble tinción con MTT y Hoechst, descrita anteriormente. Para la evaluación de la FIV, fueron considerados los siguientes criterios: cigotos monospermicos, cigotos con dos pronúcleos (PN) y cigotos con más de dos PN es decir, polispermicos (Figura 10). Utilizando microscopía de epifluorescencia (ZEISS, Axiostar Plus).



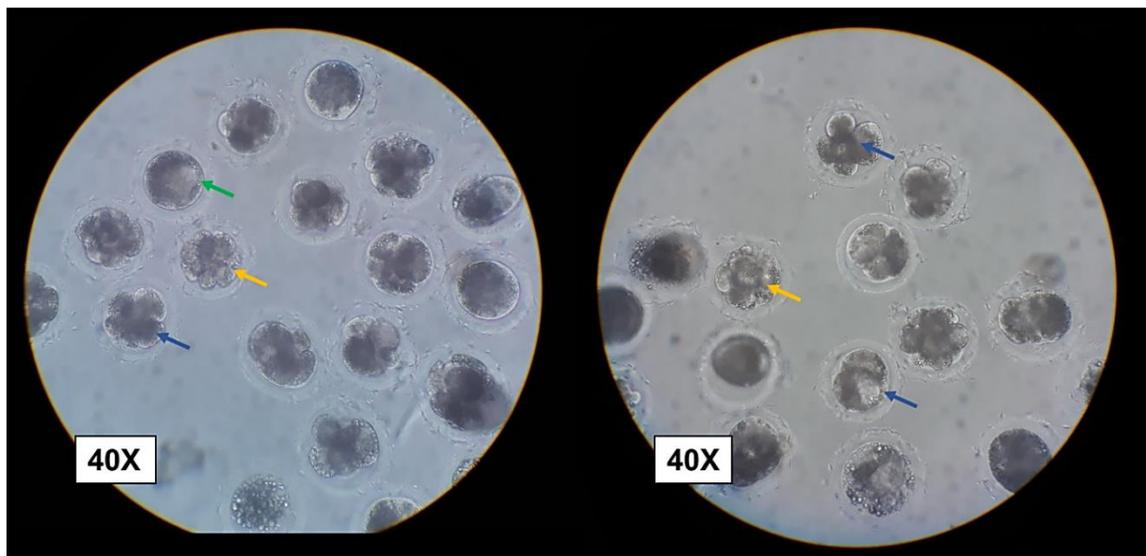
**Figura 10.** Cigotos teñidos con Hoechst. A) Cigoto con 2 PN (flechas blancas), monospermico. B) Cigoto con 4 PN, polispermico. Observados con microscopía de epifluorescencia a 40x.

---

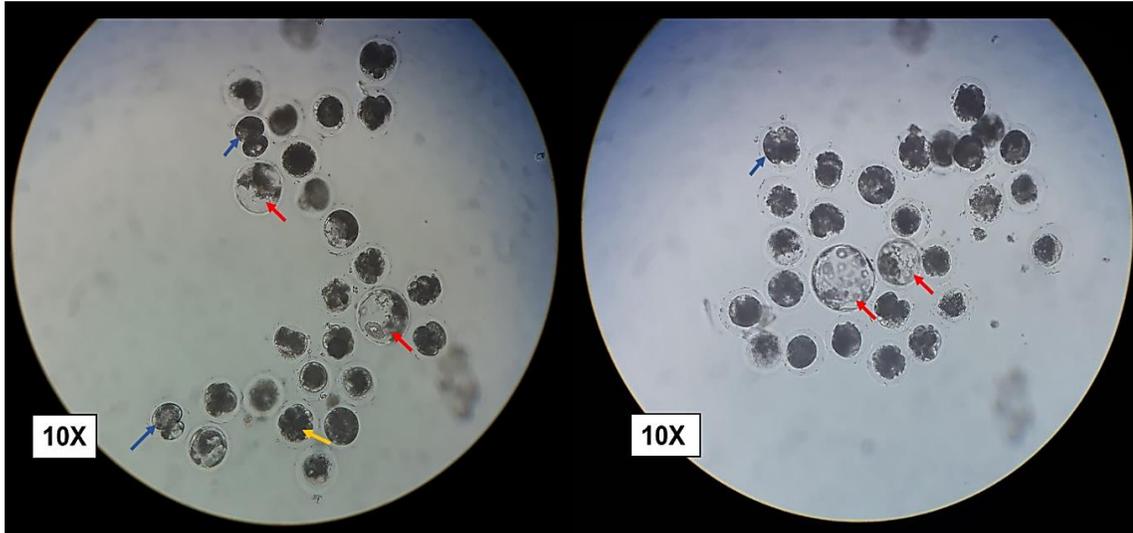
---

#### 8.4 Cultivo embrionario *in vitro*

Para el DE temprano *in vitro*, se realizó la técnica de FIV anteriormente descrita y los cigotos permanecieron 144 horas en medio NCSU-23. A las 48 horas, utilizando un microscopio invertido en campo claro (Olympus CK2, Japón), se realizó una observación de las primeras divisiones embrionarias y al término de las 144 horas se evaluó el DE considerando mórulas y blastocistos (Figura 11 y 12).



**Figura 11.** Evaluación del DE temprano *in vitro* a las 144 horas. Embriones de 2 a 8 células (flechas azules), mórulas (flechas amarillas). Embriones no divididos (flecha verde).



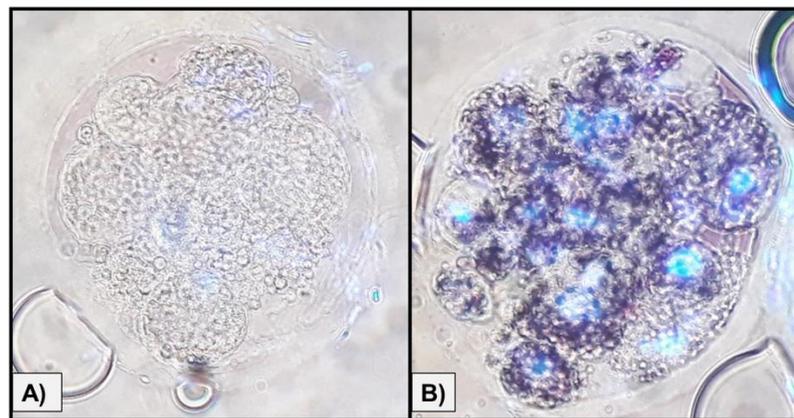
**Figura 12.** Evaluación del DE temprano *in vitro* a las 144 horas. Embriones de 2 a 8 células (flechas azules), mórulas (flechas amarillas), blastocistos (flechas rojas).

---

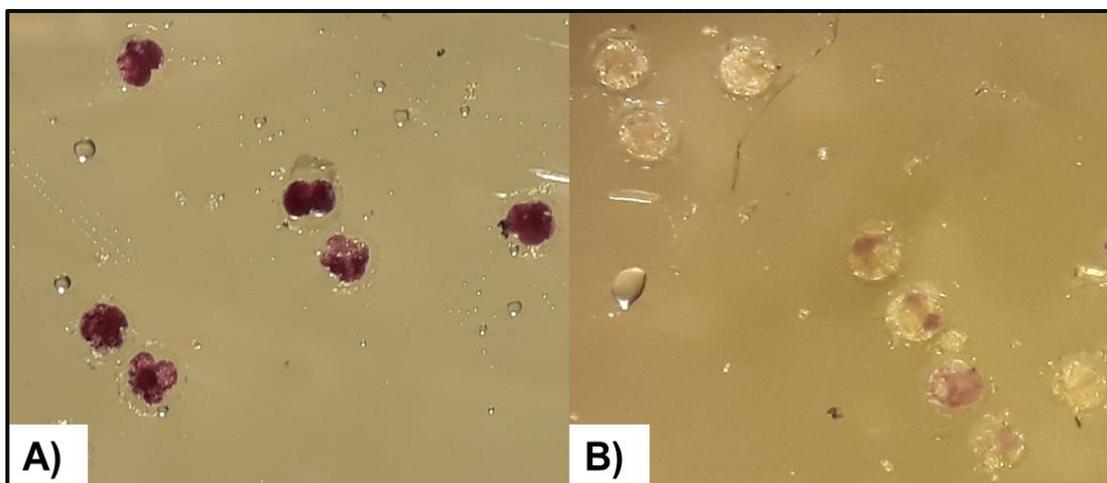
---

#### 8.4.1 Evaluación de la viabilidad de embriones tempranos

La viabilidad de los embriones se evaluó con la tinción de MTT. Se consideraron los siguientes criterios, embrión púrpura: vivo, embrión incoloro: muerto (Figura 13 y 14).



**Figura 13.** Evaluación de la viabilidad embrionaria a las 144 horas. A) Embrión en incoloro: muerto. B) Embrión purpura: vivo. Observados a 40x.

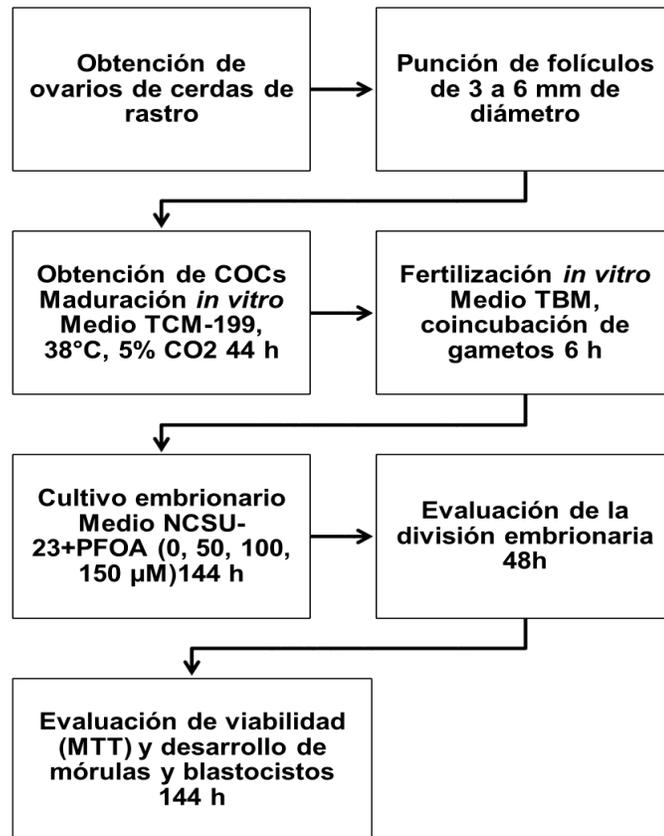


**Figura 14.** Evaluación de la viabilidad embrionaria a las 144 horas. A) Embriones púrpura: vivos. B) Embriones incoloros: muertos. Observados en microscopio estereoscópico a 10x.

---

---

## 9. Diseño experimental



- N= 5 ensayos por duplicado
- n= 25 a 35 embriones por tratamiento (0, 50, 100 y 150 µM)

### 9.1. Tratamiento con PFOA

Para evaluar el efecto del PFOA en la viabilidad y en el DE, se utilizó el PFOA Sigma número de catálogo (171468-25G). Se preparó una solución patrón 20 mM del PFOA (utilizando DMSO como diluyente) a partir de la cual se preparó una solución de trabajo 2 mM (utilizando como diluyente NCSU-23 suplementado) para obtener las concentraciones finales para cada tratamiento (50, 100 y 150 µM). (Se describe en el Anexo 16.2).

---

---

## 10. Análisis Estadístico

- La concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) se obtuvo por regresión lineal.
- Para determinar el efecto del PFOA en la viabilidad y en las etapas del DE se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman con un nivel de confianza de  $P < 0.05$ .

---

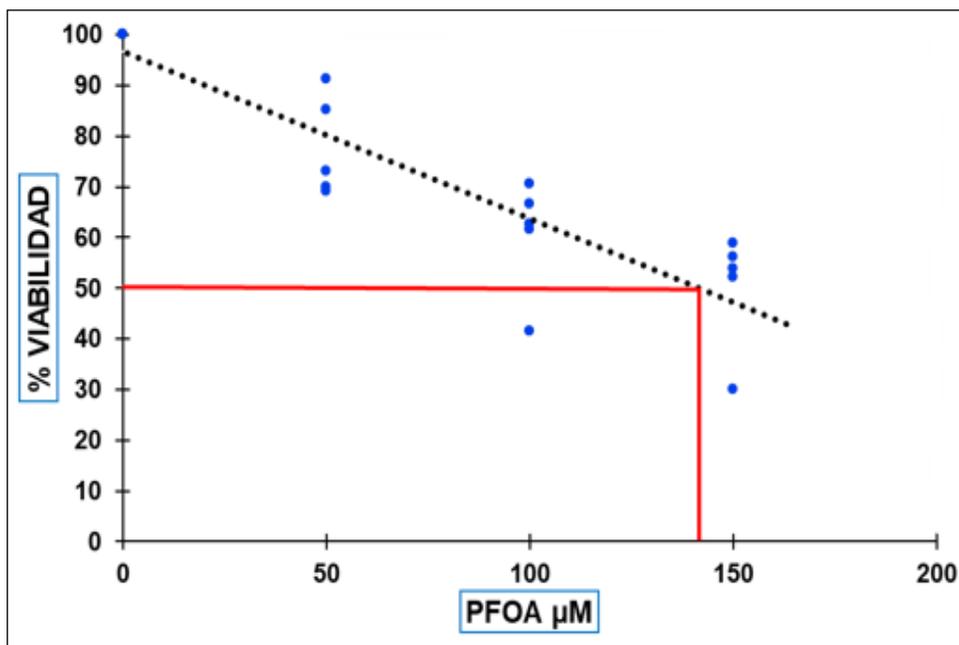
---

## 11. Resultados

### 11.1. Efecto del PFOA en la viabilidad de embriones expuestos durante 144 h.

Los resultados en la viabilidad de los embriones expuestos al PFOA durante 144 horas, mostraron una disminución dependiente de la concentración. Cada tratamiento se hizo por duplicado.

Los porcentajes de viabilidad fueron de 100, 77, 60, 49 % en las concentraciones de 0, 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$ , respectivamente. La  $\text{CL}_{50}$  del PFOA fue de 146  $\mu\text{M}$  (Gráfica 1). El Coeficiente de Spearman mostró que hay un efecto concentración dependiente ( $R = -0.9299$ ;  $P < 0.05$ ).



**Gráfica 1.** Efecto del PFOA en la viabilidad de los embriones expuestos (durante 144 h). La concentración a la que la viabilidad disminuye al 50% fue  $\text{CL}_{50} = 146 \mu\text{M}$ . ( $R = -0.9299$ ;  $P < 0.05$ ) ( $N = 5$ ,  $n = 1080$  embriones). Los datos se encuentran normalizados.

---

---

En la siguiente tabla se muestran los datos sin normalizar de la gráfica 1 con sus respectivos porcentajes.

<b>Tratamiento PFOA (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
<b>0</b>	167/269 (62)
<b>50</b>	127/270 (47)
<b>100</b>	100/271 (37)
<b>150</b>	84/270 (31)

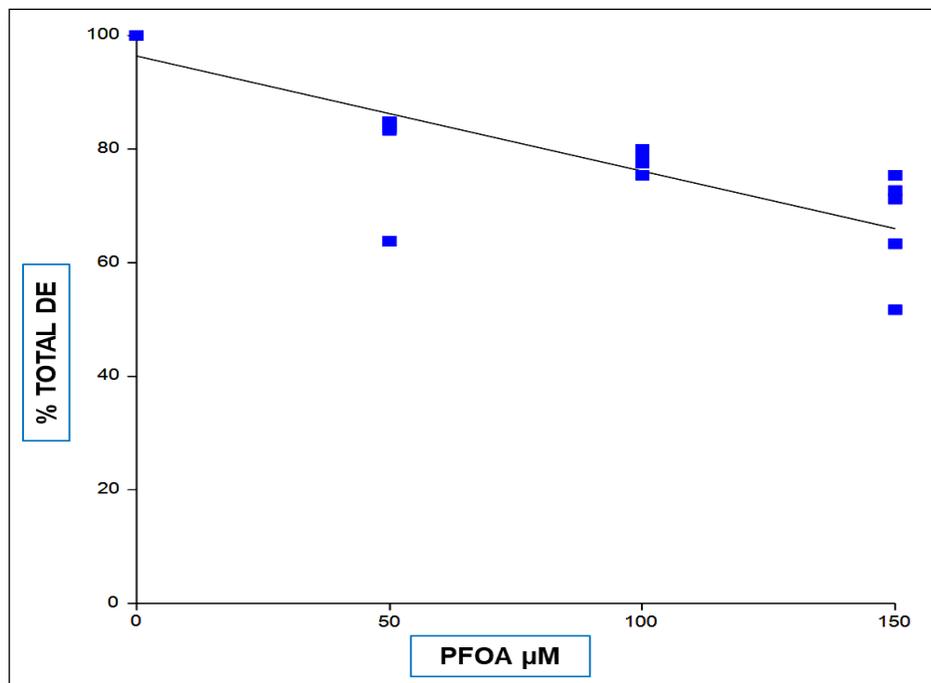
**Tabla 1.** Efecto del PFOA en la viabilidad de los embriones expuestos (durante 144 h). (N=5, n=1080 embriones). Datos no normalizados.

---

---

## 11.2. Efecto del PFOA sobre el desarrollo embrionario total a las 144 h de cultivo *in vitro*.

Los porcentajes totales del DE en cualquier estado de división expuestos al PFOA durante 144 horas, fueron de 100, 80, 77 y 67 % en las concentraciones de 0, 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$  respectivamente (Gráfica 2). El Coeficiente de Spearman mostró que hay un efecto concentración dependiente ( $R = -0.8873$ ;  $P < 0.05$ ).



**Gráfica 2.** Efecto del PFOA en la división de los embriones expuestos durante 144 horas. ( $R = -0.8873$ ;  $P < 0.05$ ), ( $N = 5$   $n = 1080$  embriones). Los datos se encuentran normalizados.

---

---

En la siguiente tabla se muestran los datos sin normalizar de la gráfica 2 con sus respectivos porcentajes.

<b>Tratamiento PFOA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>DE Total (%)</b>
<b>0</b>	171/269 (64)
<b>50</b>	135/270 (50)
<b>100</b>	131/271 (48)
<b>150</b>	113/270 (42)

**Tabla 2.** Efecto del PFOA en la división de los embriones expuestos durante 144 horas. (N=5, n=1080 embriones). Datos no normalizados.

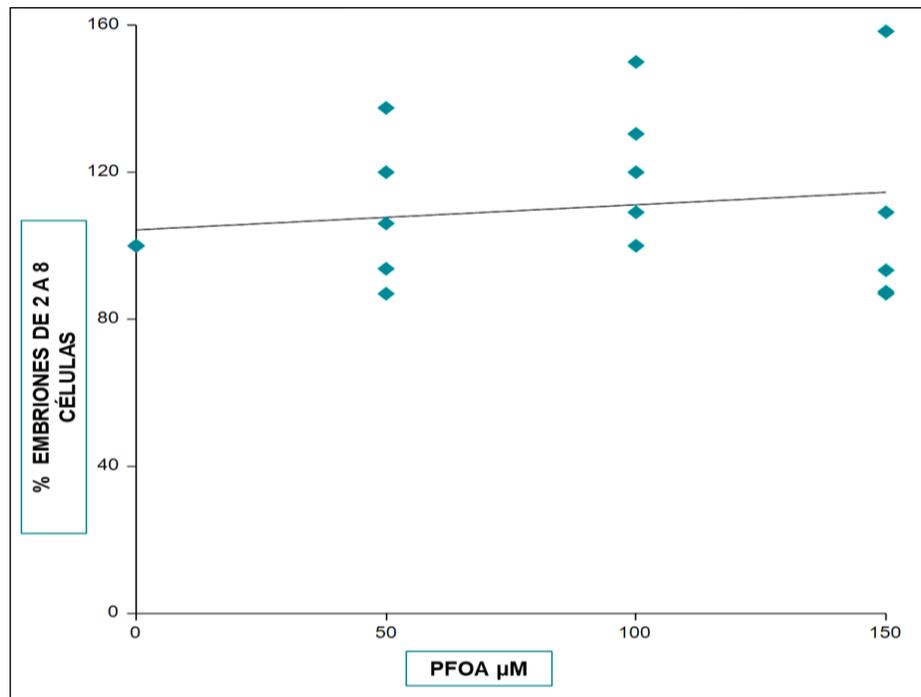
---

---

### 11.3. Efecto del PFOA sobre estadios embrionarios en 2- 8 células a las 144 h de desarrollo.

Los porcentajes en la obtención de embriones en estadios de 2-8 células, expuestos al PFOA durante 144 horas fueron de un 100 % en el grupo control, sin embargo hubo un aumento del 8, 21 y 7% en las concentraciones de 50, 100, 150  $\mu\text{M}$  respectivamente (Gráfica 3).

Los resultados se evaluaron con el Coeficiente de Correlación de Spearman, el cual mostró que no hay un efecto concentración dependiente ( $R= 0.0787$ ;  $P>0.05$ ).



**Gráfica 3.** Efecto del PFOA en la obtención de embriones en etapa de 2-8 células a las 144 horas. ( $R= 0.0787$ ;  $P>0.05$ ) ( $N= 5$   $n=1080$  embriones). Los datos se encuentran normalizados.

---

---

En la siguiente tabla se muestran los datos sin normalizar de la gráfica 3 con sus respectivos porcentajes.

<b>Tratamiento PFOA (<math>\mu</math>M)</b>	<b>2-8 Células (%)</b>
<b>0</b>	70/269 (26)
<b>50</b>	83/270 (31)
<b>100</b>	92/271 (34)
<b>150</b>	81/270 (30)

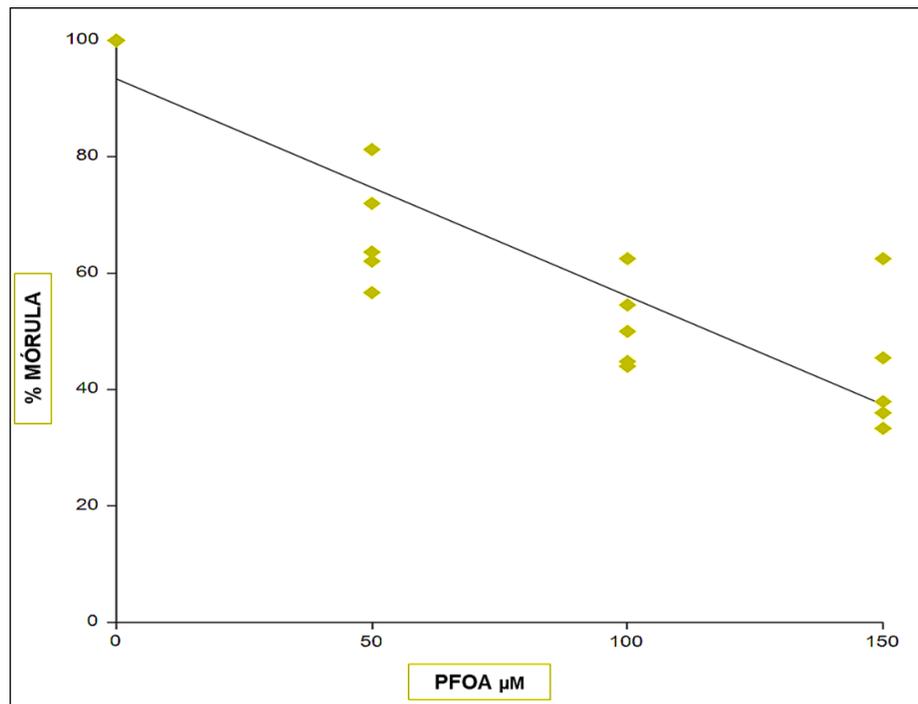
**Tabla 3.** Efecto del PFOA en la obtención de embriones en etapa de 2-8 células a las 144 horas. (N= 5 n=1080 embriones). Datos no normalizados.

---

---

#### 11.4. Efecto del PFOA sobre el estadio de mórula a las 144 h de desarrollo.

Los porcentajes de embriones en etapa de mórula obtenidos después de la exposición al PFOA durante 144 horas fueron de 100, 67, 51 y 43 % en las concentraciones de 0, 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$  respectivamente (Gráfica 4). Los resultados se evaluaron con el Coeficiente de Correlación de Spearman, el cual indicó que hay un efecto concentración dependiente ( $R = -0.8795$ ;  $P < 0.05$ ).



**Gráfica 4.** Efecto del PFOA sobre la obtención de los embriones en etapa de mórula a las 144 horas. ( $R = -0.8795$ ;  $P < 0.05$ ). ( $N = 5$   $n = 1080$  embriones). Los datos se encuentran normalizados.

---

---

En la siguiente tabla se muestran los datos sin normalizar de la gráfica 4 con sus respectivos porcentajes.

<b>Tratamiento PFOA (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Mórulas (%)</b>
<b>0</b>	75/269 (28)
<b>50</b>	50/270 (19)
<b>100</b>	38/271 (14)
<b>150</b>	32/270 (12)

**Tabla 4.** Efecto del PFOA sobre la obtención de los embriones en etapa de mórula a las 144 horas. (N= 5 n=1080 embriones). Datos no normalizados.

---

---

### 11.5. Efecto del PFOA sobre la obtención de embriones en la etapa de blastocisto las 144 h de desarrollo.

Los porcentajes de embriones obtenidos en etapa de blastocisto después de la exposición al PFOA durante 144 horas fueron de 10 y 2 % en los tratamientos de 0 y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente. En los tratamientos de 100 y 150  $\mu\text{M}$  no hubo desarrollo de blastocistos (Tabla 5). Los datos se analizaron con el Coeficiente de Correlación de Spearman, el cual indicó que hay un efecto concentración dependiente ( $R=-0.878$ ;  $P<0.05$ ).

Tratamiento PFOA ( $\mu\text{M}$ )	Blastocistos (%)
0	26/269 (10)
50	5/270 (2)
100	1/271 (0)
150	0/270 (0)

**Tabla 5.** Blastocistos obtenidos después de la exposición al PFOA. ( $R=-0.878$ ;  $P<0.05$ ) (N= 5 n=1080 embriones).

---

---

## 12. Discusión

La aplicación de técnicas de reproducción asistida tales como la MIV, FIV y la producción *in vitro* de embriones (PIVE) en el porcino, son relevantes para la investigación biomédica debido a las similitudes fisiológicas con el ser humano y su posible extrapolación a nuestra especie (Ruiz, 2010). El cerdo ha sido utilizado como un modelo de investigación para la obtención de células madre y en la producción de animales genéticamente modificados para los xenotrasplantes (Gil *et al.*, 2010). La disponibilidad y bajo costo de los ovarios porcinos de rastro han sido ampliamente utilizados como una fuente abundante de ovocitos para la realización de investigaciones en biología de la reproducción animal (Gruppen, 2014).

Los procesos reproductivos pueden alterarse por diversos factores, entre ellos los ambientales. El aumento en la actividad industrial mundial ha expuesto a los seres vivos a una amplia variedad de sustancias químicas que pueden representar una amenaza para la salud. Diversos estudios han demostrado que ciertos productos químicos industriales, como los CPFs, pueden tener efectos negativos sobre la reproducción como; acortar ciclos menstruales, incrementar los abortos espontáneos, disminuir la viabilidad y maduración de ovocitos en cultivos *in vitro* (Domínguez *et al.*, 2016; Karwacka *et al.*, 2017; Lum *et al.*, 2017).

Los CPFs han llamado la atención debido a que una vez liberados al ambiente son resistentes a la degradación por fotólisis e hidrólisis (Gorrochategui *et al.*, 2014). Es por ello que su presencia en el ambiente representa riesgo para la salud de la población mundial, estudios realizados en varios países indican la presencia del PFOA en agua y sedimento (Chen *et al.*, 2017). Además su amplio uso en la industria y su acumulación en organismos acuáticos favorecen la exposición en seres humanos, siendo la ingesta la principal vía de exposición. Una vez dentro del organismo, los CPFs pueden interferir con el metabolismo y la homeostasis incluyendo los procesos de reproducción. Lo anterior es importante ya que diversos

---

---

estudios reportan su presencia en suero sanguíneo humano, fluido folicular, cordón umbilical, placenta y leche materna (Stein *et al.*, 2014).

Diferentes investigaciones muestran que el PFOA está relacionado con alteraciones en la fertilidad femenina, sin embargo, se trata de estudios *in vivo* con personas no ocupacionalmente expuestas a este toxico, por lo que es importante analizar y mostrar el efecto *in vitro* que este compuesto puede tener en la reproducción, en este caso en el DE temprano. Este modelo *in vitro* permite conocer el impacto del PFOA en el desarrollo del embrión, cabe mencionar que la respuesta obtenida *in vivo* puede ser diferente por la participación de diversos factores dentro del organismo como el transporte sanguíneo, la acumulación en órganos o tejidos y la excreción (Silbergeld, 2001), además de la presencia de otros tóxicos en el ambiente.

### **12.1. Efecto del PFOA en la viabilidad de embriones expuestos durante 144 horas.**

Los resultados presentados en este trabajo muestran que la viabilidad de los embriones expuestos al PFOA durante el cultivo resultó afectada de manera concentración dependiente, ya que conforme se incrementó la concentración del PFOA disminuyó el número de embriones vivos. Se determinó que la CL<sub>50</sub> del PFOA fue de 146 µM. Esta concentración es menor a la reportada en plasma sanguíneo de trabajadores ocupacionalmente expuestos, la cual fue de 276 µM (Slotkin *et al.*, 2008), lo que implicaría que la fertilidad de esta población podría tener problemas de fertilidad dado que las concentraciones en plasma sanguíneo son mayores a las utilizadas en este estudio.

En otra investigación se evaluó la fertilidad en mujeres sometidas a programas de técnicas de reproducción asistida, específicamente FIV y transferencia embrionaria y se reportó una relación entre la concentración de una mezcla de CPFs 13 ng/mL (0.026 µM) presentes en el fluido folicular, con una disminución en las tasas de fertilización y de transferencia embrionaria (Governini *et al.*, 2011). Aunque

---

---

la CL<sub>50</sub> en este trabajo es de 146 μM, resulta relevante ya que las diferencias encontradas pueden deberse a varias razones, entre ellas puede mencionarse que en nuestro modelo de estudio los embriones estuvieron expuestos al PFOA durante 144 horas, en comparación con el estudio reportado en donde las mujeres fueron expuestas a la contaminación industrial desde antes de la ovulación, aunado a que contenían una mezcla de CPFs en el fluido folicular. Además en el estudio de Governini *et al.*, 2011, la exposición a los CPFs fue *in vivo* donde existen más variables, mientras que el presente trabajo fue *in vitro* y con condiciones controladas siendo la única variable la concentración del PFOA. Los resultados del presente trabajo podrían dar una posible explicación para entender la baja fertilidad *in vivo*.

Una posible explicación por la cual el PFOA afectó la viabilidad de los embriones puede deberse a procesos de muerte celular ya que se ha reportado que el PFOA activa la vía apoptótica mitocondrial intrínseca en hepatocitos y en células del colon humana, iniciando con la activación del receptor pregnano (PXR) el cual se ha caracterizado como sensor de xenobióticos (regulando la expresión de genes implicados en el metabolismo y eliminación de fármacos), las señales de apoptosis pueden ser disparadas por la activación de PXR por el PFOA, desencadenando la vía apoptótica. Otra señal puede ocurrir por la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), las cuales dañan el ADN provocando la activación de p53 la cual activa la expresión de genes apoptóticos, resultando en muerte celular (Liu *et al.*, 2017).

Otro estudio indicó que la exposición al PFOA genera estrés oxidativo, cuando la administración por ingesta en ratones gestantes inhibió significativamente la función lútea a través del estrés oxidativo disminuyendo actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, además incrementó la expresión de proteínas apoptóticas tales como BAX y P53 (Chen *et al.*, 2017). Se sabe que una excesiva generación de EROS puede provocar estrés oxidativo, por lo que el PFOA podría estar involucrado con la fisiopatología de varias

---

---

enfermedades del sistema reproductor femenino tales como la endometriosis, el síndrome de ovario poliquístico y abortos espontáneos (Sharma y Agarwal, 2004). La disminución de la viabilidad de embriones en este estudio puede haber ocurrido por estrés oxidativo que pudo conducir hacia la vía de apoptosis, con lo cual podría estar promoviendo problemas de infertilidad al disminuir la viabilidad embrionaria.

## **12.2. Efecto del PFOA sobre el DE *in vitro* durante 144 horas.**

La evaluación del DE total después de la exposición al PFOA, tuvo un efecto dependiente de la concentración, se hizo una evaluación de las diferentes etapas embrionarias para determinar el efecto que el PFOA podría provocar. La evaluación de los embriones divididos en 2 a 8 células no mostró efecto en ninguno de los tratamientos, sin embargo, el efecto del PFOA se aprecia en las etapas posteriores del desarrollo, principalmente mórula y blastocisto. Las explicaciones por las cuales el PFOA provoca una baja formación de mórulas se describen a continuación.

Los CPFs pueden interactuar con el ADN, rompiendo los enlaces covalentes originado un cambio conformacional e incluso afectar los procesos de replicación, reparación y expresión génica (Zhang et al., 2009). Se sabe que durante las etapas más tempranas de los embriones (2-8 células), es donde se encuentran más susceptibles a experimentar daños en el ADN (Hamdoun y Epel, 2007), y es también en estas etapas donde ocurre el proceso de activación del genoma embrionario que origina cambios morfológicos y bioquímicos en el embrión que le permiten continuar con el proceso de desarrollo hacia etapas de desarrollo posterior (Oestrup *et al.*, 2009), es decir mórulas y blastocistos. La presencia del PFOA durante la etapa de 2 a 8 células puede ser crucial para que no se lleve a cabo la exitosa activación del genoma embrionario, conduciendo a la baja formación de mórulas y por consiguiente disminuir, arrestar e incluso impedir la formación de blastocistos.

---

---

Se ha demostrado la participación del PFOA en la generación de estrés oxidativo en células de mamíferos generando el incremento de las EROS y con ello se alteran moléculas tales como los lípidos, las proteínas y el ADN. También provoca daño en mitocondrias, bloqueo de células embrionarias, agotamiento de ATP, apoptosis y fragmentación. El bloqueo en la etapa de 2 células embrionarias está asociado con una explosión oxidativa, lo que sugiere que el embrión puede ser particularmente vulnerable a las EROS en esta etapa. El daño ocurrido en el embrión resultará en apoptosis y fragmentación del ADN o mortalidad en etapas posteriores. Cuando hay un daño genético algunos embriones pueden llegar a la etapa de blastocisto, sin embargo, la selección natural garantiza que la mayoría de ellos termine en un aborto (Sharma y Agarwal, 2004). Esta puede ser una de las causas de la baja formación de mórulas y blastocitos, en presencia del PFOA que podría haber provocado un estrés oxidativo en los embriones dañando al ADN reduciendo con ello el potencial del DE y que redundaría en una baja formación de mórulas y blastocistos. Esto mostraría su participación en la disminución de la fertilidad femenina.

Otra posible explicación por la cual ocurre una baja formación de mórulas es que el PFOA pueda estar interfiriendo en la funcionalidad de moléculas como la Cadherina-E, una proteína relacionada con la formación de uniones adherentes, la cual se une a proteínas citoplasmáticas como cateninas y posteriormente a filamentos de actina. Los complejos de cadherina son importantes ya que favorecen la unión entre los blastómeros permitiendo que ocurra la compactación embrionaria lo cual da lugar a la formación de mórula (Trejo *et al.*, 2008).

Además se ha reportado la participación de los CPFs en la alteración en la homeostasis del Calcio en células somáticas y durante la MIV de ovocitos (Domínguez *et al.*, 2019), por lo cual la presencia del PFOA en el cultivo embrionario podría estar afectando el equilibrio en los niveles de Calcio promoviendo la descompactación de los embriones y de esta manera afectar el progreso en la etapa

---

---

de mórula (Kleszczyński y Składanowski, 2011). Cabe mencionar la importancia del Calcio en el citoesqueleto, ya que participa en la redistribución de las moléculas de adhesión celular y de los microfilamentos de actina, antes de que ocurra la compactación de los embriones. La homeostasis de Calcio en los embriones compactos es muy importante ya que se ha reportado que una desestabilización en los niveles de Calcio o el bloqueo de los canales de este ión, provoca la descompactación embrionaria (Trejo *et al.*, 2008).

Finalmente en la obtención de blastocistos en el grupo control se obtuvo un porcentaje del 10% (que se encuentra en el rango de los estudios *in vitro* con este modelo), mientras que en la concentración de 50  $\mu$ M se obtuvo un 2% y en los otros tratamientos no se desarrolló ningún blastocisto. Este efecto negativo puede deberse a que el daño pudo ocurrir en etapas más tempranas del desarrollo en el genoma embrionario, generación de EROS y alteración en la funcionalidad de la cadherina o en las uniones comunicantes, lo que repercutió en el desarrollo de los embriones hacia la etapa de blastocisto.

Una explicación más sobre la baja formación de blastocistos puede deberse a que se ha demostrado que los CPFs alteran la funcionalidad de las uniones comunicantes durante la maduración de ovocitos porcinos (Domínguez *et al.*, 2016). La funcionalidad de las uniones comunicantes tipo hendidura durante la formación de blastocistos es muy importante entre los blastómeros internos, ya que permiten la comunicación intercelular y el intercambio de sustancias y moléculas como AMPc y Calcio, las cuales son necesarias en la coordinación de las divisiones celulares para el progreso de los embriones (Trejo *et al.*, 2008), es posible que el PFOA haya alterado la funcionalidad de estas uniones repercutiendo en una baja o nula formación de blastocistos en los tratamientos con este perfluorado. Sin embargo, se requieren más estudios para corroborarlo.

---

---

### 13. Conclusión

- ❖ En este trabajo, de acuerdo a los resultados obtenidos se muestra que la exposición al PFOA afecta la reproducción, ya que redujo la viabilidad y el desarrollo de los embriones porcinos.
- ❖ El presente estudio permitió determinar que el PFOA presente en el medio de cultivo embrionario afectó la viabilidad de los embriones a una  $CL_{50}$  de 146  $\mu\text{M}$ , con efecto concentración dependiente.
- ❖ El DE analizado a las 144 horas de exposición al PFOA, demostró que este compuesto permite el desarrollo en las etapas más tempranas, es decir, en embriones de 2 a 8 células.
- ❖ Al realizar la evaluación de las diferentes etapas, se mostró que el PFOA afecta la formación de mórulas y en blastocistos llega a inhibirse a partir de la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de manera concentración dependiente.

---

---

## 14. Perspectivas

- ❖ Realizar más estudios para determinar los mecanismos moleculares por los cuales el PFOA está disminuyendo la viabilidad de los embriones.
- ❖ Diseñar experimentos con marcadores celulares para conocer las causas y comprobar nuestras hipótesis del por qué el PFOA está reduciendo el potencial de desarrollo de los embriones hacia el progreso a las etapas posteriores, es decir mórulas y blastocistos.
- ❖ Realizar la exposición a diferentes tiempos para comprobar cuál es la etapa más susceptible al daño por la exposición al PFOA.

---

---

## 15. Bibliografía

Artus, J., y Chazaud, C. (2014). A close look at the mammalian blastocyst: epiblast and primitive endoderm formation. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3327–3338.

Arukwe, A., Mortensen, A. (2011). Lipid peroxidation and oxidative stress responses of salmon fed a diet containing perfluorooctane sulfonic or perfluorooctane carboxylic acids. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 154, 288–295

Bach, C.C., Liew, Z., Bech, B.H., Nohr, E.A., Fei, C., Bonefeld-Jorgensen, E.C., Henriksen, T.B., Olsen, J. (2015). Perfluoroalkyl acids and time to pregnancy revisited: An update from the Danish National Birth Cohort. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source.* 14, 59.

Betancourt, M., Bonilla, E., Casas, E., Ducolomb, Y. (2003). Maduración de gametos y fertilización de mamíferos. En *Biología Celular y Molecular* (México, CDMX: Pearson), pp. 686–706.

Bonilla, E., Altamirano, M., Casas, E., Fierro, R., Ducolomb, Y., Betancourt, M. (2001) Identificación de reprotóxicos en el laboratorio. *Biología de la Reproducción II UAM-PUIS.* pp. 55-73.

Carrillo, D.F., Lenis Sanin, Y., Rodriguez Osorio, N. (2014). Conceptos básicos del desarrollo embrionario de la vaca. En *reproducción de la vaca manual didáctico sobre la reproducción, gestación, lactancia y bienestar de la hembra bovina.* Universidad de Antioquia. 4, 70-76.

Chai, J., Lei, P., Xia, X., Xu, G., Wang, D., Sun, R., Gu, J., Tang, L. (2017). Pollution patterns and characteristics of perfluorinated compounds in surface water adjacent potential industrial emission categories of Shanghai, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 659–664.

---

---

Chaparro-Ortega, A., Betancourt, M., Rosas, P., Vázquez-Cuevas, F.G., Chavira, R., Bonilla, E., Casas, E., Ducolomb, Y. (2018). Endocrine disruptor effect of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) on porcine ovarian cell steroidogenesis. *Toxicol. In Vitro.* 46, 86–93.

Chen, Y., Zhou, L., Xu, J., Zhang, L., Li, M., Xie, X., Xie, Y., Luo, D., Zhang, D., Yu, X. (2017). Maternal exposure to perfluorooctanoic acid inhibits luteal function via oxidative stress and apoptosis in pregnant mice. *Reprod. Toxicol.* 69, 159–166.

Chen, F., Yin, S., Kelly, B.C., Liu, W. (2017). Isomer-Specific Transplacental Transfer of Perfluoroalkyl Acids: Results from a Survey of Paired Maternal, Cord Sera, and Placentas. *Environ. Sci. Technol.* 51, 5756–5763.

Darrow, L., Howards, P., Winqvist, A., Steenland, K. (2014). PFOA and PFOS Serum Levels and Miscarriage Risk. *Epidemiology.* 25, 505–512.

Domínguez, A., Salazar, Z., Arenas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Casas, E., Teteltitla, M., Bonilla, E. (2016). Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA.* 35, 93–99.

Domínguez, A., Salazar, Z., Betancourt, M., Ducolomb, Y., Casas, E., Fernández, F., Bahena, I., Salomón, A., Teteltitla, M., Martínez, R. (2019). Effect of perfluorodecanoic acid on pig oocyte viability, intracellular calcium levels and gap junction intercellular communication during oocyte maturation in vitro. *Toxicol. In Vitro.* 58, 224–229.

Dorts, J., Kestemont, P., Marchand, P., D'Hollander, W., Thezenas, M., Raes, M., Silvestre, F. (2011). Ecotoxicoproteomics in gills of the sentinel fish species, *Cottus gobio*, exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquat Toxicol.* 103, 1–8

Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M., Betancourt, M. (2009). In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes

---

---

fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biology and Toxicology*. 25, 623–633.

Fei, C., McLaughlin, J.K., Tarone, R.E., Olsen, J. (2007). Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Environ. Health Perspect.* 115, 1677–1682.

Fei, C., McLaughlin, J.K., Tarone, R.E., Olsen, J. (2008). Fetal growth indicators and perfluorinated chemicals: a study in the Danish National Birth Cohort. *Am. J. Epidemiol.* 168, 66–72.

Fei, C., McLaughlin, J.K., Lipworth, L., Olsen, J. (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24, 1200–1205.

Gebbink, W.A., Hebert, C.E., Letcher, R.J. (2009). Perfluorinated Carboxylates and Sulfonates and Precursor Compounds in Herring Gull Eggs from Colonies Spanning the Laurentian Great Lakes of North America. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7443–7449.

Gil, M., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J., Roca, J., Martinez, E. (2010). Advances in Swine In Vitro Embryo Production Technologies: Advances in Swine In Vitro Embryo Production. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 40–48.

Gilbert, S.F. (2005). *Biología del desarrollo* (Buenos Aires: Médica Panamericana).

Gorrochategui, E., Pérez-Albaladejo, E., Casas, J., Lacorte, S., Porte, C. (2014). Perfluorinated chemicals: Differential toxicity, inhibition of aromatase activity and alteration of cellular lipids in human placental cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 277, 124–130.

Governini, L., Orvieto, R., Guerranti, C., Gambera, L., De Leo, V., Piomboni, P. (2011). The impact of environmental exposure to perfluorinated compounds on oocyte fertilization capacity. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 415–418.

---

---

Governini, L., Guerranti, C., De Leo, V., Boschi, L., Luddi, A., Gori, M., Orvieto, R., Piomboni, P. (2015). Chromosomal aneuploidies and DNA fragmentation of human spermatozoa from patients exposed to perfluorinated compounds. *Andrologia*. 47, 1012–1019.

Gruppen, C.G. (2014). The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology*. 81, 24–37.

Guo, J., Zhao, M.-H., Shin, K.-T., Niu, Y.-J., Ahn, Y.-D., Kim, N.-H., and Cui, X.-S. (2017). The possible molecular mechanisms of bisphenol A action on porcine early embryonic development. *Scientific Reports*. 7, 8632.

Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (México: McGraw-Hill Interamericana).

Hamdoun, A., y Epel, D. (2007). Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1745–1750.

Hölzer, J., Midasch, O., Rauchfuss, K., Kraft, M., Reupert, R., Angerer, J., Kleeschulte, P., Marschall, N., Wilhelm, M. (2008). Biomonitoring of perfluorinated compounds in children and adults exposed to perfluorooctanoate-contaminated drinking water. *Environ. Health Perspect.* 116, 651–657.

Karwacka, A., Zamkowska, D., Radwan, M., Jurewicz, J. (2017). Exposure to modern, widespread environmental endocrine disrupting chemicals and their effect on the reproductive potential of women: an overview of current epidemiological evidence. *Hum. Fertil.* 1–24.

Kleszczyński, K., y Składanowski, A.C. (2011). Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. III. Disturbance in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 251, 163–168.

---

---

Krafft, M.P., y Riess, J.G. (2015). Per- and polyfluorinated substances (PFASs): Environmental challenges. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 20, 192–212.

Kummu, M., Sieppi, E., Koponen, J., Laatio, L., Vähäkangas, K., Kiviranta, H., Rautio, A., Myllynen, P. (2015). Organic anion transporter 4 (OAT 4) modifies placental transfer of perfluorinated alkyl acids PFOS and PFOA in human placental ex vivo perfusion system. *Placenta* 36, 1185–1191.

Li, K., Gao, P., Xiang, P., Zhang, X., Cui, X., Ma, L.Q. (2017). Molecular mechanisms of PFOA-induced toxicity in animals and humans: Implications for health risks. *Environ. Int.* 99, 43–54.

Liu, C., Gin, K.Y.H., Chang, V.W.C. (2014). Multi-biomarker responses in green mussels exposed to PFCs: effects at molecular, cellular, and physiological levels. *Environ Sci Pollut Res.* 21, 2785–2794.

Lum, K.J., Sundaram, R., Barr, D.B., Louis, T.A., Louis, G.M.B. (2017). Perfluoroalkyl Chemicals, Menstrual Cycle Length, and Fecundity: Findings from a Prospective Pregnancy Study. *Epidemiology.* 28, 90–98.

Maisonet, M., Terrell, M.L., McGeehin, M.A., Christensen, K.Y., Holmes, A., Calafat, A.M., Marcus, M. (2012). Maternal concentrations of polyfluoroalkyl compounds during pregnancy and fetal and postnatal growth in British girls. *Environ. Health Perspect.* 120, 1432–1437.

Martin, J.H., Bromfield, E.G., Aitken, R.J., Nixon, B. (2017). Biochemical alterations in the oocyte in support of early embryonic development. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 469–485.

Motas Guzmàn, M., Clementini, C., Pérez-Cárceles, M.D., Jiménez Rejón, S., Cascone, A., Martellini, T., Guerranti, C., Cincinelli, A. (2016). Perfluorinated carboxylic acids in human breast milk from Spain and estimation of infant's daily intake. *Sci. Total Environ.* 544, 595–600.

---

---

Ngo, H.T., Hetland, R.B., Sabaredzovic, A., Haug, L.S., Steffensen, I.-L. (2014). In utero exposure to perfluorooctanoate (PFOA) or perfluorooctane sulfonate (PFOS) did not increase body weight or intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia (Min/+) mice. *Environ. Res.* 132, 251–263.

Oestrup, O., Hall, V., Petkov, S.G., Wolf, X.A., Hyldig, S., Hyttel, P. (2009). From zygote to implantation: morphological and molecular dynamics during embryo development in the pig. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 44 Suppl 3, 39–49.

Okabe, M. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development.* 140, 4471–4479.

Paradis, F., Moore, H., Novak, S., Dyck, M.K., Dixon, W.T., Foxcroft, G.R. (2009). Global protein profiling of porcine cumulus cells in response to native oocyte secreted factors in vitro. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 66, 119–120.

Peropadre, A. (2014). “Estudio *in vitro* de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes”. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid.

Polge, C. (1978). Fertilization in the pig and horse. *J. Reprod. Fertil.* 54, 461–470.

Rajkovic, A., Pangas, S.A., Matzuk, M.M. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. In Knobil and Neill’s *Physiology of Reproduction*. (Third Edition), J.D. Neill, ed. (St Louis: Academic Press). 10, 383–423.

Reader, K.L., Stanton, J.-A.L., Juengel, J.L. (2017). The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. *Biology.* 6, 2–22.

Repetto, M. (1997). *Toxicología fundamental*. 3ª Edición. Ed. Diaz de Santos. España. pp. 17-40.

Ruiz, S. (2010). Fecundación *in vitro* en la especie porcina: Situación actual y perspectivas. 30, 66–70.

---

---

Salomon, A. (2015). “Efecto del Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS) en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos y su repercusión en la fertilización y el desarrollo embrionario”. Tesis de maestría. UAMI. México.

Sharma, R.K., y Agarwal, A. (2004). Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reproductive Medicine and Biology*. 3, 177–199.

Silbergeld, E. (2001). *Toxicología* (Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales Subdirección General de Publicaciones).

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

Steenland, K., y Woskie, S. (2012). Cohort mortality study of workers exposed to perfluorooctanoic acid. *Am. J. Epidemiol.* 176, 909–917.

Stein, C.R., Savitz, D.A., Bellinger, D.C. (2014). Perfluorooctanoate exposure in a highly exposed community and parent and teacher reports of behaviour in 6-12-year-old children. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 28, 146–156.

Teteltitla, M. (2018). “Efecto del ácido perfluorooctanoico (PFOA) en la generación de estrés oxidante y su impacto durante la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos”. Tesis de Doctorado. En proceso. UAMI. México.

Trejo, A., Navarro, M. del C., Ambriz, D. (2008). El proceso de compactación celular en el embrión temprano. *ContactoS.* 67, 57–60.

Urbina, M.T., y Lerner Biber, J. (2008). *Fertilidad y reproducción asistida* (Caracas: Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela : Médica Panamericana).

Vélez, M.P., Arbuckle, T.E., Fraser, W.D. (2015). Maternal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fecundity: the MIREC study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 30, 701–709.

---

---

Wu, K., Xu, X., Peng, L., Liu, J., Guo, Y., Huo, X. (2012). Association between maternal exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) from electronic waste recycling and neonatal health outcomes. *Environ. Int.* *48*, 1–8.

Yahia, D., El-Nasser, M.A., Abedel-Latif, M., Tsukuba, C., Yoshida, M., Sato, I., Tsuda, S. (2010). Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure to pregnant mice on reproduction. *J. Toxicol. Sci.* *35*, 527–533.

Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote Camb. Engl.* *2*, 371–372.

Yen, S y Jaffes, R. (2009). *Endocrinologia Reproductiva: Fisiologia, Patofisiologia y Gestionclínica*. Ed. 6ª. Editorial. ELSELVIER.

Zhang, H., y Liu, K. (2015). Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Hum. Reprod. Update.* *21*, 779–786.

Zhang, X., Chen, L., Fei, X.-C., Ma, Y.-S., Gao, H.-W. (2009). Binding of PFOS to serum albumin and DNA: insight into the molecular toxicity of perfluorochemicals. *BMC Mol. Biol.* *10*, 16.

Zheng, X.-M., Liu, H.-L., Shi, W., Wei, S., Giesy, J.P., Yu, H.-X. (2011). Effects of perfluorinated compounds on development of zebrafish embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* *19*, 2498–2505.

Zuccotti, M., Merico, V., Cecconi, S., Redi, C.A., Garagna, S. (2011). What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum. Reprod. Update.* *17*, 525–540.

---

---

## 16. Anexos

### 16.1. Medios de Cultivo

#### TL-HEPES-PVA

Componente	PM	mM	g/1000 mL
NaCl	58.45	114	6.6633
KCl	74.55	3.20	0.2386
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	120.00	0.34	0.0408
Lactato de Na	112.10	10.00	1.4 ml
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	203.30	0.50	0.1017
HEPES	238.30	10.0	2.3830
Piruvato de Na	110.00	0.20	0.0220
Sorbitol	182.20	12.00	2.1860
NaHCO <sub>3</sub>	84.00	2.00	0.1680
Gentamicina	575.67		0.0250
Penicilina G	372.5		0.0650
PVA			0.1000
CaCl 2H <sub>2</sub> O **	147.00	2.00	0.2940

- \*\* Agregar al final
- Utilizar Agua desionizada
- Ajustar pH a 7.3 - 7.4 con "Na OH" o "HCl" 1N
- Filtrar y almacenar a 4 °C

---

---

### Medio de maduración TCM- 199

#### TCM-199 suplementado con:

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

#### Medio TCM-199 se suplementa con:

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

- Filtrar y almacenar a 4°C en un máximo de 3 semanas.

---

---

### Medio de Fertilización TBM

Componente	mM	g /200 mL	g /100 mL
NaCl	113.1	1.32	0.6611
KCl	3.0	0.0448	0.0224
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	7.5	0.2204	0.1102
Tris (Base)	20,0	0.4846	0.2423
Glucosa	11.0	0.3964	0.1982
Piruvato de Na	5.0	0.11	0.055

- Utilizar agua desionizada
- No ajustar el pH
- Filtrar y almacenar a 4°C en un máximo de 3 semanas.

### Medio de lavado de espermatozoides DPBS

Suplementar con:

Componente	g/250 mL de DPBS
CaCl <sub>2</sub>	0.025
Penicilina	0.025
Estreptomina	0.0187

- Ajustar el pH 7.2-7.3
- Filtrar

---

---

### Medio de Cultivo Embrionario NCSU-23

Componente	Mm	g/100 mL	g/50 mL
NaCl	108.73	0.6355	0.31775
KCl	4.78	0.0356	0.0178
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	0.0162	0.0081
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.19	0.0293	0.0121
D-Glucosa	5.55	0.1	0.05
Glutamina	1.00	0.0146	0.0073
Taurina	7.00	0.0876	0.0438
Hipotaurina	5.00	0.0546	0.0273
NaHCO <sub>3</sub>	25.07	0.2106	0.1053
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.70	0.025	0.0125
Penicilina G	75 µg/mL	0.0075	0.00375
Estreptomina	50 µg/mL	0.005	0.0025

- Utilizar agua desionizada
- Ajustar pH 7.7-7.3
- Filtrar y almacenar a 4°C en un máximo de 3 semanas

---

---

## 16.2. Tratamiento con PFOA

Solución de trabajo:

100  $\mu$ L del PFOA + 900  $\mu$ L Medio NCSU-23= 1mL (2 mM)

<b>Concentración del PFOA (<math>\mu</math>M)</b>	<b>DMSO (%)</b>	<b>PFOA (Solución de trabajo a 2mM) (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Medio NCSU-23 (<math>\mu</math>L)</b>
50	0.25	12	488
100	0.5	25	475
150	0.75	37	463



Efecto del Acido perfluorooctanoico en el desarrollo embrionario in vitro en el porcino.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 26 del mes de julio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE  
DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO  
DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS  
DRA. MARIA MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS

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

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: JIMENA PEREZ DOMINGUEZ

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

APROBAR.

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



JIMENA PEREZ DOMINGUEZ  
ALUMNA

REVISO

MTRA. ROSALIA FERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO

VOCAL

DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

SECRETARIA

DRA. MARIA MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS