



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00041

Matrícula: 2143800777

EFFECTO DEL ÁCIDO PERFLUOROOCTANOICO (PFOA) EN LA GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDANTE E INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR EN LA OVOGÉNESIS TEMPRANA DE RATÓN, *IN VITRO*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 31 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ
DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES
DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR
DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO

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

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: MARTHA PATRICIA LOPEZ ARELLANO



MARTHA PATRICIA LOPEZ ARELLANO
ALUMNA

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

VOCAL

DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES

VOCAL

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

SECRETARIO

DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO



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

**EFFECTO DEL ÁCIDO PERFLUOROCTANOICO (PFOA) EN LA GENERACIÓN DE
ESTRÉS OXIDANTE E INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR EN LA OVOGÉNESIS
TEMPRANA DE RATÓN, *IN VITRO*.**

TESIS

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

Presenta:

Biol. Exp. Martha Patricia López Arellano

Director:

Dr. Edmundo Bonilla González

Asesores:

Dr. Eduardo Casas Hernández
Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Ciudad de México, 31 de marzo de 2017

MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES

DIRECTOR:

Dr. Edmundo Bonilla González

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Expresión Génica S248

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

Correo: mundo@xanum.uam.mx

ASESORES:

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular

Departamento Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

Correo: dino@xanum.uam.mx

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Profesor Asociado “C”

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental

Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. UNAM.

Correo: juserom@unam.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dr. Eduardo Casas Hernández

PRESIDENTE

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa
Correo: dino@xanum.uam.mx

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

SECRETARIO

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental
Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. UNAM.
Correo: juserom@unam.mx

Dra. María Cristina González Torres

VOCAL

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa
Correo: mcgt@xanum.uam.mx

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar

VOCAL

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa
Correo: bioquimicajejs@hotmail.com

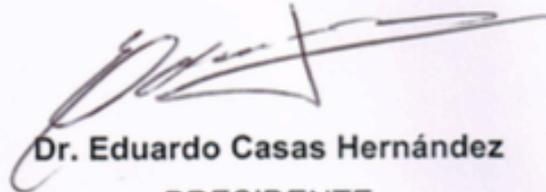
Este trabajo se realizó en el laboratorio de expresión génica S-248 del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Edmundo Bonilla González y la asesoría del Dr. Eduardo Casas Hernández y Dr. Juan José Rodríguez Mercado.

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

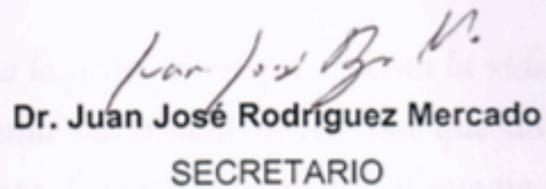
Este estudio fue apoyado por el CONACyT con el número de proyecto 0105961-M. y con la beca Otorgada a Martha Patricia López Arellano con el número de CVU:620441.

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN.

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN.



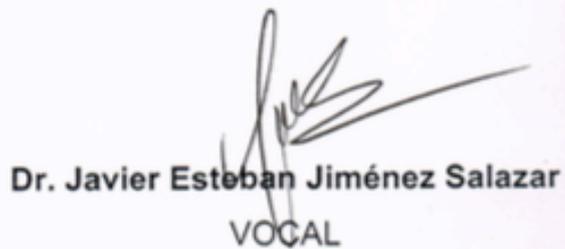
Dr. Eduardo Casas Hernández
PRESIDENTE



Dr. Juan José Rodríguez Mercado
SECRETARIO



Dra. María Cristina González Torres
VOCAL



Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar
VOCAL

“Eso es lo que atrae a la gente joven que se gana la vida con sus profesiones o investigando. Hay una curiosidad intelectual que los estimula. Tiene que ver con un sentimiento de realización personal que no se puede obtener en el mundo real”.

Murakami, H.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas las personas que de una manera u otra han sido clave en mi vida y que han hecho posible la elaboración de esta tesis.

Especialmente quiero agradecer a las siguientes personas:

Dr. Edmundo Bonilla por el apoyo, dirección y la confianza para realizar este trabajo, pero sobre todo por sus consejos tanto en lo laboral como en lo personal.

Al Dr. Eduardo Casas y Dr. Juan José Rodríguez por compartir sus conocimientos y su tiempo para la realización y revisión de esta tesis.

Al Dr. Miguel Galván por facilitarnos el equipo para la realización de los cortes y la confianza brindada.

Al Dr. Pablo Damián Matsumura por el apoyo, los consejos y sobre todo las palabras de aliento que nos dio a mí y a mi familia.

A la Dra. Zayil por la calidad humana para tratar a las personas y sobre todo por brindarnos a mí y a mi hermana una sonrisa siempre en el laboratorio.

Al Dr. Humberto González Márquez muchas gracias por el apoyo, consejos y risas brindadas.

Al laboratorio S-252 y S-255 por todo el apoyo y confianza brindada.

Agradezco, sobre todo, a Dios por regalarme la oportunidad de tener lo más importante en mi vida que es mi familia.

A mis padres el Sr. Arturo y la Sra. Martha, no hay palabras o cosa que pueda hacer o decirles para agradecer todo lo que han hecho por mí y por mis hermanos, por todo el apoyo, la confianza, consejos y cariño que nos han brindado.

A mis hermanos Mario, Arturo y a mi hermanita Keila por el apoyo incondicional que me han brindado, gracias por las risas, las travesuras, por ser mis cómplices e impulsarme siempre a lograr cada uno de mis sueños. “GRACIAS LÓPEZ”.

A mis primos Los López Arellano y López Soto, por siempre estar y apoyar a lo más importante en mi vida a mi familia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Mario, Graciela, Ale, Lalo, Ángeles, Andrea, Iván Oseguera, Lupita y Diana, muchas gracias por hacernos a mí y a mi hermana un rato agradable en el laboratorio, gracias por las risas y por los ratos de convivencia.

Gracias en especial a las personitas que conocí en este tiempo Bani gracias por ayudarme a recuperar toda mi información, gracias por las pláticas, los consejos y la confianza. Faby, gracias por esta amistad, por las pláticas súper desestresantes y divertidas muchas gracias monstrita. Javier Esteban muchísimas gracias por el apoyo, por las clases y por los ánimos brindados en los momentos de crisis y desesperación cuando las cosas no salían como tenía que salir y por prestarme el ZOE.

INDÍCE

MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES.....	ii
MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN.....	iii
MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN.....	v
AGRADECIMIENTOS	vii
INDÍCE.....	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Toxicología reproductiva.....	2
1.2 Compuestos perfluorados.....	4
1.3 Estrés oxidante	8
1.4 Muerte celular	11
2 ANTECEDENTES	14
2.1 Ácido perfluorooctanoico.....	14
3 JUSTIFICACIÓN.....	18
4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	19
5 HIPÓTESIS.....	19
6 OBJETIVO GENERAL.....	19
7 OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
8 MATERIAL Y MÉTODO.....	20
8.1 Material Biológico:	20
8.2 Medios de Cultivo:	20
8.3 Kits:.....	20
8.4 Extracción de ovarios de ratona	21
8.5 Determinación de la CL ₅₀	21
8.6 Determinación de especies reactivas de oxígeno intracelular.....	22
8.7 Análisis del tipo de muerte celular	22
8.8 Análisis estadístico.....	23
8.9 Diseño experimental.....	24
9 RESULTADOS.....	25
9.1 Efecto del PFOA sobre la viabilidad de ovocitos fetales <i>in vitro</i>	26
9.2 Ensayo de viabilidad.....	28

9.3	Concentración letal media (CL ₅₀).....	29
9.4	Generación de estrés oxidante en los ovocitos expuestos a PFOA durante la ovogénesis temprana.	30
9.5	Cuantificación de ERO.	31
9.6	Tipo de muerte celular ocasionada por PFOA durante la ovogénesis temprana en ovocitos fetales de ratón <i>in vitro</i>	32
9.7	Ensayos de muerte celular sobre los ovocitos fetales de ratón.....	33
10	DISCUSIÓN.....	35
11	CONCLUSIONES.....	42
12	PERSPECTIVAS.....	43
13	BIBLIOGRAFÍA.....	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de PFOA y PFOS (Andersen et al., 2007).....	14
Figura 2. a) Explante de ovario fetal de ratón de 5 días de cultivo a 100X. En b, c, y d) Explante de ovario fetal de ratón de 7 días de cultivo de 19.5E a 200X. En las figuras se observan los ovocitos fetales presentes en los fragmentos de ovario, las flechas indican los ovocitos.	25
Figura 3. Explante de ovario de ratón tratados con PFOA. Control (sin PFOA), DMSO, 50, 100 y 150 μ M de PFOA 200X se observa una disminución de los ovocitos en las concentraciones más altas.	26
Figura 5. Efecto en la viabilidad de ovocitos de ratón in vitro expuestos a PFOA durante un periodo de 24h. Los valores representan las medias \pm E.E de seis experimentos independientes. *P<0.05	28
Figura 6. Viabilidad de ovocitos de ratón expuestos a diferentes concentraciones de PFOA durante 24h. Se observa una correlación negativa en relación a las concentraciones de PFOA.	29
Figura 7. Generación de ERO en ovarios fetales de ratón expuestos a diferentes concentraciones de PFOA,100X, la figura muestra los cortes de ovario fetal donde se apreciar un incremento en la fluorescencia presente en estos, siendo el control positivo H ₂ O ₂ donde hay un incremento mayor de fluorescencia, seguido de nuestra concentración CL ₅₀ (112.8 μ M), lo que indica una mayor generación de ERO	30
Figura 8. Cuantificación de ERO en ovarios de ratón expuestos a PFOA por 24 h. Los valores representan las medias \pm E.E. * Muestra diferencias significativas. Fisher. P<0.05. n=3.	31
Figura 9 Explante de ovario de siete días de cultivo, teñidos con Anexina(Rojo) y BOBO 1(Verde), expuestos a concentraciones subletales de PFOA. 200X. .	32
Figura 10.Ovocitos teñidos en verde con BOBO-1(Necrosis), ovocitos teñidos en rojo con Anexina-V 568 (Apoptosis) y Hoechst en azul. En gris observamos	

los ovocitos en campo claro, en azul se observan los ovocitos teñidos con Hoechst, en verde se observan los ovocitos que presentan muerte celular y en rojo se observan los ovocitos que presentan muerte por apoptosis. 33

Figura 11. Muerte celular en ovocitos fetales de ratón expuestos durante 24h a PFOA. Los valores representan las medias \pm E.E. * Muestra diferencias significativas. Fisher. $P < 0.05$. $n = 3$. En la figura se observa cómo se incrementa el porcentaje de muerte en los ovocitos de una manera dependiente de la concentración. 34

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
CAR	Receptor androstano
CAT	Catalasa
CL ₅₀	Concentración letal cincuenta
CO ₂	Dióxido de carbono
DCFHDA	2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DMSO	Dimetil sulfóxido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FF	Fluido folicular
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
Gap	Uniones intercelulares comunicantes o hendidura
GR	Glutación reductasa
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HepG ₂	Línea hepatocelular
LH	Hormona Luteinizante
LOP	Peroxidación lipídica
MDA	Malondialdehído
MTT	Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2 ilo)-2,5-difeniltetrazol
NO	Óxido nítrico
\cdot OH	Radical hidroxilo
O ₂ \cdot^-	Anión superóxido
ONOO \cdot	Anión peroxinitrito le falta a la fórmula la carga
PFCs	Compuestos perfluorados
PFDA	Ácido perfluorodecanoico
PFHxS	Ácido perfluorohexano sulfónico
PFOA	Ácido perfluorooctanoico
PFOS	Ácido perfluorooctano sulfónico
PGC	Células germinales primordiales

PPAR	Receptores activadores de proliferación de peroxisomas
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
T ₃	Triyodotironina sérica
T ₄	Tiroxina
TNF	Factor de necrosis tumoral
ZOE	Microscopio de tecnología LED

RESUMEN

Durante el siglo XX, se ha producido un aumento de los productos en el medio ambiente que pueden ser perjudiciales para la función reproductiva en humanos. Por lo tanto, al comenzar el siglo XXI, es conveniente evaluar las futuras direcciones en el campo de la toxicología reproductiva. En las últimas décadas, millones de toneladas de productos químicos sintéticos se han fabricado y liberado al ambiente.

Los humanos han estado expuestos constantemente a agentes potencialmente tóxicos ya sea de una manera directa o indirecta, y poco se sabe sobre los efectos adversos que estos pueden causar sobre las células germinales. Se ha reportado que niveles elevados de ácido perfluorooctanoico (PFOA) están relacionados con subfecundidad, en tanto que niveles elevados de compuestos perfluorados en el suero humano se han asociado con una reducción en el número de espermatozoides normales por eyaculado. Sin embargo, los efectos del PFOA en la ovogénesis de mamíferos no se ha explorado.

En este estudio se determinó la toxicidad del PFOA en la ovogénesis temprana de ratón, la viabilidad de los ovocitos se determinó mediante el conteo de éstos en los explantes y con tinción de MTT. Se determinó la concentración letal 50 (CL_{50}) de PFOA en ovocitos de ratón la cual fue de $112.86\mu\text{M}$. Además de la viabilidad se estudiaron dos parámetros, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el tipo de muerte celular causados por PFOA. En el caso de los dos parámetros anteriores (ERO y muerte celular) se observó que son dependientes de la concentración, generándose ERO, y muerte celular tanto necrosis como apoptosis en la concentración de $28\mu\text{M}$ ($\frac{1}{4}$ de la CL_{50}); En la concentración $112.86\mu\text{M}$ se incrementaron ambos parámetros. Este estudio aporta datos acerca del riesgo que representa este compuesto perfluorado para la ovogénesis de varias especies de mamíferos, incluida la especie humana, en tanto que el investigar el tipo de muerte celular causado por PFOA en los ovocitos será útil para entender los mecanismos moleculares por los que este xenobiótico causa daño celular.

ABSTRACT

During the 20th century, there has been an increase in environmental products that may be detrimental to human reproductive function. Therefore, at the beginning of the 21st century, it is convenient to evaluate future directions in the field of reproductive toxicology. In the last decades, millions of tons of synthetic chemicals have been manufactured and released to the environment.

Humans have been constantly exposed to potentially toxic agents either directly or indirectly, and little is known about the adverse effects these can cause on germ cells. Elevated levels of perfluorooctanoic acid (PFOA) have been reported to be related to subfertility, while elevated levels of perfluorinated compounds in human serum have been associated with a reduction in the number of normal spermatozoa per ejaculate. However, the effects of PFOA on mammalian oogenesis have not been explored.

In this study, we determined the toxicity of PFOA in early oogenesis of mouse, the viability of the oocytes was determined by counting them in the explants and MTT staining. The lethal 50 (LC₅₀) concentration of PFOA in mouse oocytes was 112.86 μ M. To determine the toxicity of PFOA, in addition to viability two parameters were studied: generation of reactive oxygen species (ROS) and type of cell death. In the case of the two previous parameters (ERO and cell death), they were found to be concentration dependent, generating ROS and necrotic and apoptotic cell death in the concentration of 28 μ M ($\frac{1}{4}$ of the LC₅₀); At 112.86 μ M both parameters were increased. This study provides data on the risk of this perfluorinated compound for oogenesis of several mammalian species, including the human species, while investigating the type of cell death caused by PFOA in oocytes will be useful for understanding the molecular mechanisms by which this xenobiotic causes cellular damage.

1 INTRODUCCIÓN.

Las células germinales primordiales (PGC) que migran a las crestas gonadales requieren de procesos adecuados de proliferación, así como de diferenciación a gametos maduros, espermatozoides en machos u ovocitos en hembras (Sun et al., 2014). Las células de la línea germinal son responsables de la transmisión de la información genética y epigenética entre generaciones, y garantizar la creación de nuevos individuos. La formación de los ovocitos en las hembras, es un evento temprano en el desarrollo embrionario que se produce cuando las PGC migran hasta la cresta gonadal antes de diferenciarse en ovocitos. Durante el desarrollo fetal las PGC del ovario pasan por diferenciación. Inicialmente se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica. En las hembras, toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal. Justo antes o poco después del nacimiento se produce la primera detención de la meiosis en el estadio de diploteno de la profase I (estadio dictioteno). En este momento, el ovocito comienza a ser rodeado por células pregranulosas que forman una membrana basal alrededor de las mismas, generando el compartimento folicular (Gomez, 2010). En mamíferos, las hembras nacen con un número finito de células germinales (ovocitos) encerrados en folículos primordiales. Estos últimos, están formados de un ovocito detenido meióticamente en la etapa de Profase I, rodeado por células de la granulosa; la mayoría de los ovocitos permanecen en estado inactivo durante muchos años en los humanos, hasta alcanzar la pubertad (Sobinoff et al., 2010) donde por la acción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) se reanuda la meiosis, hasta su maduración (Gilbert, 2005).

1.1 Toxicología reproductiva.

Una de las ramas de la toxicología es la toxicología reproductiva, la cual estudia los efectos perjudiciales producidos por agentes químicos exógenos (xenobióticos) en la reproducción; por ejemplo, sobre los procesos reproductivos en hembras en las que se incluyen etapas como el estro, la fertilización, la gestación o la lactancia. Por otro lado, la toxicología del desarrollo estudia las alteraciones producidas en la descendencia como resultado de la exposición de hembras gestantes o lactantes a estos agentes (Bonilla, 2000)

Dentro de los xenobióticos se incluyen agentes químicos naturales (hidrocarburos y metales pesados) o sintéticos (herbicidas, insecticidas y compuestos perfluorados) los cuales pueden afectar cualquiera de las etapas del ciclo reproductivo e interferir en la reproducción o desarrollo pre o postnatal de los individuos (Bonilla, 2000).

Los daños causados en los ovarios por xenobióticos es un tema de preocupación, debido al papel fundamental de estos órganos en la reproducción (Hoyer y Keating, 2014). Las células de la línea germinal son responsables de la transmisión de la información genética y epigenética entre generaciones, la cual garantizar la creación de nuevos individuos (Sun et al., 2014).

El daño inducido por xenobióticos a los folículos primordiales puede provocar insuficiencia ovárica, que afecta a los folículos en crecimiento más grandes y retrasa la ovulación, causando así infertilidad (Hoyer y Keating, 2014). La tasa de pérdida de los folículos primordiales está determinada por influencia genética y ambiental, pero ciertas exposiciones a tóxicos pueden acelerar el proceso de insuficiencia ovárica prematura y, en consecuencia, la prematura entrada a la menopausia (Connie et al., 2011).

Los folículos primordiales no son el único blanco de los reprotóxicos, es decir, los folículos pueden ser afectados en todas las etapas del desarrollo por la exposición a xenobióticos que provocan efectos adversos en la foliculogénesis, en la competencia de los ovocitos, en la ovulación y sobre la producción de hormonas. Por lo tanto, la exposición a estos agentes representa un riesgo significativo para la salud (Bhattacharya y Keating, 2011).

El daño producido por xenobióticos a la población de folículos antrales es significativo, ya que podría resultar en una reducción de la fertilidad y principios de la senescencia reproductiva. Además, los folículos antrales son responsables de la síntesis de las hormonas esteroides (estrógenos, andrógenos, y progesteronas); por lo que lesiones a esta población de folículos podría impedir la secreción de hormonas, y resultar en niveles de la hormona atípicos, causando ciclicidad anormal (Miller et al., 2006)

1.2 Compuestos perfluorados

Los compuestos perfluorados (PFCs, por sus siglas en inglés), son sustancias químicas producidas desde la década de 1950, que se caracterizan por la presencia de fuertes enlaces carbono-flúor unidos por enlaces covalentes y un grupo funcional (carboxilo o sulfhídrido) estos se dividen en *Perfluoroalquil-sulfonatos* como el ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS) ácido perfluorohexanosulfónico (PFHxS) y los *Perfluoroalquil-carboxilatos* entre los que se encuentran el ácido perfluooctanoico (PFOA) y el ácido perfluorodecanoico (PFDA). Se utilizan en una amplia gama de aplicaciones industriales y de consumo alimenticio (Fei et al., 2009; Whitworth et al., 2012; Yang et al., 2014; Florentin et al., 2011).

Los PFCs son contaminantes persistentes en el ambiente; son ampliamente utilizados y los podemos encontrar en telas, alfombras, envases de alimentos, utensilios de cocina (sartenes antiadherentes), insecticidas, espumas de extintores y diversos productos para el hogar. En la industria se emplea en tensoactivos y emulsionantes (Potera, 2009).

Los PFCs más conocidos son el sulfonato de perfluorooctano (PFOS), el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y sus derivados que pertenecen al grupo de sustancias perfluoroalquiladas. Los PFCs son resistentes a la degradación ambiental, y algunos de ellos se han descubierto como contaminantes globales del aire, agua y suelo. En el año 2000, la producción de PFOS se estimó en más de 3,500 toneladas y un exceso de 500 toneladas más para PFOA (Jensen y Leffers, 2008; Lau et al., 2006).

Los PFOA y PFOS no se metabolizan y tienen una vida media en humanos de alrededor de 4 y 5 años, respectivamente. La vía de exposición es a través de la ingesta oral o inhalado y, en menor medida, a través de la exposición cutánea (Fei et al., 2007). La reciente detección de compuestos perfluorados en la vida silvestre

en incluso en lugares remotos como zonas polares, ha despertado el interés debido a su aparición en el ambiente y a los efectos que provocan estos agentes químicos. Aunque cada vez se sabe más sobre la distribución mundial de los PFCs, todavía hay poca información disponible sobre sus efectos en la vida silvestre (Hu et al., 2003).

La bioacumulación también ocurre en los seres humanos, y prácticamente todas las personas en el planeta tiene trazas de estos PFC en la sangre y órganos internos como el hígado, riñones, bazo, vesícula biliar y en las gónadas. En la sangre, el PFOS y el PFOA se unen a las proteínas séricas. La toxicidad aguda de las sustancias polifluoradas es moderada pero algunos PFCs puede inducir la proliferación de peroxisomas en el hígado de rata y puede cambiar la fluidez de las membranas celulares. Algunas de estos PFCs, como PFOS y PFOA, son considerados potenciales tóxicos sobre el desarrollo, se sospecha que actúan como disruptores endocrinos modificando los niveles de hormonas sexuales; por ejemplo, aumentan los niveles de estradiol y bajan los niveles de testosterona (Jensen y Leffers, 2008). Se ha reportado que concentraciones elevadas de PFOS y PFOA están relacionadas con subfecundidad, en tanto que niveles elevados de PFCs en el suero humano se han asociado con una reducción en el número de espermatozoides normales por eyaculado (Joensen et al., 2009).

La amplia distribución de los perfluorados en el medio ambiente, su bioacumulación en los seres humanos y la vida silvestre, así como el aumento de evidencias de la toxicidad reproductiva y sobre desarrollo han llamado la atención por parte de los organismos públicos y reguladores (Takacs y Abbott, 2006; Hu y Hu, 2009). Uno de los principales mecanismos de acción de PFCs es a través de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPAR. Los PPAR son factores nucleares descubiertos por su capacidad de responder a los xenobióticos con proliferación de peroxisomas en el hígado de los roedores. Los PPARs pertenecen a una superfamilia de receptores que funcionan como factores de transcripción que regulan cambios en la expresión génica del PPAR α , en la

activación del receptor androstano constitutivo (CAR) y en el receptor X de pregnanos y que, mediante la formación de peroxisomas, intervienen en importantes procesos tales como la diferenciación celular, la organogénesis, el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y en la tumorigénesis (Pereiro y Lafuente, 2012; Schrader y Fahimi, 2006)

Los PPARs existen en tres isoformas (α , β y δ), que se expresan con predominio de unas u otras en dependencia del tejido que se trate. Cada isoforma es activada preferentemente por algún proliferador específico e interviene en procesos metabólicos diferentes, acorde con la fisiología y el metabolismo de los tejidos donde se expresan (Desouza y Fonseca, 2009). El PPAR α se expresa principalmente en órganos y tejidos donde es muy importante el catabolismo de ácidos grasos y de glucosa para la producción de energía como el hígado y los músculos (Pereiro y Lafuente, 2012; Ferrer, 2014; Schiffrin, 2003).

Los compuestos Proliferadores de peroxisomas comprenden una familia muy grande de químicos, incluyendo muchos compuestos químicos como ftalatos y ácido graso perfluorados, productos agroquímicos como los ácidos fenoxiacético e importantes fármacos como el ácido acetilsalicílico y agentes hipolipidémicos, tales como los derivados de fibrato. Los efectos más ampliamente caracterizados de la proliferación de peroxisomas en roedores es el aumento en el número y tamaño de los peroxisomas, la hipertrofia del hígado, así como un incremento en la β -oxidación de ácidos grasos por parte de los peroxisomas hepáticos. El tratamiento prolongado de los roedores con los proliferadores de peroxisomas da como resultado la formación de tumores en el hígado (Yang et al., 2000; Schrader y Fahimi, 2004).

En células somáticas está bien documentado que diferentes PFCs interfieren con las uniones intercelulares comunicantes, también llamadas de hendidura o uniones Gap (Upham et al., 2009; Upham et al., 1998). Las uniones comunicantes Gap son conjuntos de canales de membrana intercelulares que permiten a las células adyacentes compartir moléculas pequeñas (<1 kDa). Estas uniones

comunicantes se componen de conexinas, una familia homóloga de más de 20 proteínas (Kidder y Mhawi, 2002).

En el desarrollo de los folículos, la comunicación entre células somáticas y el ovocito es esencial para el crecimiento de los ovocitos y la regulación de la maduración meiótica. En particular, las células de la granulosa proporcionan nutrientes y señales moleculares que regulan el desarrollo de los ovocitos. Los ovocitos, por otra parte, promueven la organización del folículo, la proliferación de células de la granulosa, la diferenciación y función de las células del *cumulus* (Eppig, 2005; Santiquet et al., 2012).

Los PFC afectan la homeostasis de calcio y la función de las mitocondrias las cuales tienen un papel crucial en la apoptosis inducida por químicos perfluorados (Kleszczynski et al., 2009). En vertebrados, se ha reportado que contaminantes medioambientales (xenobióticos) modulan el sistema defensivo antioxidante causando estrés oxidante mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (Nwani et al., 2010).

1.3 Estrés oxidante

El estrés oxidante es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre moléculas pro-oxidantes que incluyen a las especies reactivas de oxígeno (ERO) (ion superóxido $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrogeno H_2O_2 y radical hidroxilo $\cdot OH$) y nitrógeno (óxido nítrico NO) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y la defensa antioxidante enzimática (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) y la no enzimática (vitamina C, vitamina E, selenio, zinc, taurina, hipotaurina, glutatión y carotenos). Esta relación puede ser alterada por el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y / o especies reactivas de nitrógeno (RNS), o una disminución en los mecanismos de defensa antioxidantes (Baumber et al., 2000; Agarwal et al., 2005; Trachootham et al. 2008; Agarwal et al., 2014; Dai et al., 2015). Uno de los mecanismos que reduce las ROS inicia con la dismutación del $O_2^{\cdot-}$, a H_2O_2 bajo la influencia del superóxido dismutasa, seguido de la catalasa y el glutatión peroxidasa que actúan convirtiendo el H_2O_2 en agua (Agarwal et al., 2005; Dai et al., 2015).

Las ERO se han implicado en más de 100 enfermedades. Tienen un papel fisiológico y patológico en el tracto reproductivo femenino. Numerosos estudios en humanos y animales han demostrado la presencia de ERO en el tracto reproductor femenino: ovarios, oviductos. Las ERO están implicadas en la modulación de todo un espectro de funciones reproductoras fisiológicas tales como la maduración de ovocitos, la esteroidogénesis ovárica, la función del cuerpo lúteo y la luteólisis. El ovario de mamífero es un órgano metabólicamente activo y genera gran cantidad de ERO durante las fases finales de la foliculogénesis. Las ERO modulan la detención fisiológica de la meiosis (es decir, detención en diploteno en ovocitos foliculares, así como la detención de la metafase II (MII) en los ovocitos ovulados en la mayoría de las especies de mamíferos (Tiwari et al., 2015).

El ovario es la fuente de ovocitos y regula la secreción normal de las hormonas en las hembras. ERO se producen dentro del folículo como una parte normal de la

reproducción debido a factores tanto internos como externos. Sin embargo, la generación excesiva de estas causas estrés oxidante, un mediador importante del desarrollo de folículos y ovocitos, puede dañar muchas moléculas importantes en los ovocitos y en las células de la granulosa dentro de los folículos ováricos, y puede acelerar el envejecimiento del ovocito. Además, se sabe que el estrés oxidante puede desencadenar o exacerbar los procesos patológicos que afectan a la reproducción femenina. Trastornos de la fertilidad femeninas relacionados con el estrés oxidante pueden tener mecanismos etiopatogénicos comunes. Las ERO también puede originarse en el metabolismo del embrión y de su entorno (Ashok et al., 2005; Zhang et al., 2014; Goud et al., 2008).

En niveles fisiológicos bajos, las ERO son mediadoras de funciones celulares esenciales como la expresión de genes, la fosforilación de proteínas, la activación de los factores de transcripción, la síntesis de ADN o la proliferación celular, las ERO funcionan como "mensajeros redox" en la regulación y señalización intracelular, incluyendo muerte de patógenos invasores, cicatrización de heridas, y los procesos de reparación tisular. En condiciones basales, las células humanas producen unos 2 billones de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en una célula por día, cuya fuente mayoritaria son las mitocondrias (Turrens, 1997). Estos organelos consumen entre el 80-90% del oxígeno celular, el cual reducen a agua para obtener energía en forma de ATP. Mientras que en concentraciones elevadas inducen modificaciones oxidativas de las macromoléculas, alterando la función de las proteínas, así como promoviendo la muerte celular (Circu y Aw, 2010; Bhattacharyya et al., 2014; Poljsak et al., 2013; Vaquero y Morelo, 2005; Devine et al., 2012).

La toxicidad del oxígeno es un desafío inherente a la vida aeróbica. Las ERO pueden modular las funciones celulares, y el estrés oxidante puede poner en peligro el medio intracelular que resulta en supervivencia celular o células dañadas en proceso de muerte celular. Su papel en diversas enfermedades del tracto reproductor femenino ha sido investigado; por ejemplo, pueden afectar diversas funciones fisiológicas en el tracto reproductivo y niveles excesivos pueden dar

lugar a patologías que afectan la reproducción. Además, el estado oxidante puede influir en el desarrollo temprano del embrión mediante la modificación de los principales factores de transcripción y por lo tanto modificar la expresión de genes. Las concentraciones de las ERO también pueden desempeñar papeles importantes tanto en la implantación y la fertilización de los ovocitos. En la actualidad, ha aumentado interés para examinar el papel de estrés oxidante en la reproducción femenina, ya que puede ser un enlace importante en el rompecabezas de la infertilidad, así como en algunas enfermedades de los órganos reproductivos, tales como endometriosis (Ashok et al., 2005).

1.4 Muerte celular

Las células expuestas a los estímulos mecánicos, infecciones por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes, mueren de una manera incontrolable, como resultado de su descomposición estructural inmediata (Galluzzi et al., 2015).

La muerte celular se puede clasificar de acuerdo con su apariencia morfológica que puede ser apoptótico, necrótico, autofagia, criterios de enzimológicos con y sin la participación de nucleasas o de distintas clases de proteasas, tales como caspasas (Haouzi y Hamamah, 2009; Kroemer et al., 2009).

La muerte celular programada, o apoptosis, denota un proceso regulado genéticamente de suicidio celular. La muerte celular resulta de un mecanismo autónomo y fisiológico activado por señales intrínsecas o estímulos externos. La apoptosis se ha observado en una serie de sistemas y es esencial para la eliminación de células, perjudiciales o defectuosas. Una característica esencial de la apoptosis es que la muerte ocurre a través de una secuencia ordenada y estereotipada de eventos citológicos (Sheng y Vara, 1999).

La apoptosis es usada por organismos multicelulares para eliminar células dañadas o no necesarias de una forma perfectamente controlada que minimiza el daño de las células vecinas. Los restos celulares resultantes, que están siempre rodeados de membrana plasmática, son eliminados mediante fagocitosis, evitando la inflamación en esa zona. La célula que muere por apoptosis sufre una serie de cambios morfológicos, se reduce su volumen, la membrana celular se altera y aparecen protuberancias (“blebbing”), el citoplasma y los orgánulos celulares se condensan y se liberan factores del interior de la mitocondria que promueven la muerte (Porrás y Mazo, 2010).

La apoptosis se considera como un evento vital en el desarrollo embrionario de diversas especies, así como una parte esencial en la conservación de la homeostasis tisular. En el desarrollo embrionario la apoptosis está presente en la organogénesis (Haouzi y Hamamah, 2009).

Debido a la naturaleza cíclica del sistema reproductor femenino, el ovario, el endometrio y la glándula mamaria sostienen ciclos continuos de crecimiento celular y apoptosis en respuesta a los cambios hormonales. La muerte celular apoptótica desempeña múltiples funciones durante el desarrollo embrionario. Está implicada en esculpir tejidos y sirve para eliminar las estructuras que ya no son necesarios. Está claro que la apoptosis juega un activo e importante papel en las funciones fisiológicas del ovario. La apoptosis juega un importante papel durante la foliculogénesis y la selección del folículo dominante y también juega una parte en la regresión del cuerpo lúteo (Meresman, 2011).

En el ovario, la apoptosis folicular ocurre continuamente durante la vida reproductiva hasta que ésta concluye, lo que provoca una fase de senescencia en que las células totipotenciales ya no son renovadas. La muerte celular por apoptosis es un fenómeno biológico que puede ser detectado morfológicamente, las células en vía de apoptosis presentan cambios en citoplasma y núcleo (Flores et al., 2005).

Los mecanismos de la apoptosis son altamente ordenados y complejos, e implican cascadas de eventos moleculares dependientes de energía. Existen dos vías principales para la iniciación de la apoptosis. La vía denominada 'extrínseca', mediada por receptores de muerte; un subgrupo de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). La segunda vía, conocida como la vía 'intrínseca' está controlada por los miembros de la familia Bcl-2. Ambas vías tienen

el mismo resultado: la activación de cascada de enzimas proteolíticas, los miembros de la familia de las caspasas (Sprick y Walczak, 2004).

La necrosis ha sido considerada, durante muchos años, un modo accidental de la muerte celular, lo que implica que es un proceso no regulado. Sin embargo, hay evidencia que la ejecución de la muerte celular necrótica también está regulada por vías de señalización. Por ejemplo, los receptores de dominio de muerte, como TNFR1, y los receptores de tipo Toll-like se han reportado para desencadenar necrosis, en particular en presencia de inhibidores de caspasa. Además, se ha informado que la muerte celular necrótica en respuesta a estímulos de estrés celulares, incluyendo isquemia o la citotoxicidad del glutamato en las neuronas o células cancerosas expuestas a agentes alquilantes que dañan el ADN. Morfológicamente, la necrosis se caracteriza por una ganancia en el volumen celular, inflamación de los orgánulos y ruptura de la membrana plasmática, lo que resulta en la pérdida de contenido intracelular (Fulda et al., 2010).

2 ANTECEDENTES

2.1 Ácido perfluorooctanoico.

El ácido perfluorooctanoico (PFOA), contiene 8 átomos de carbono y un grupo carboxilo al final de la cadena, su fórmula química es $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{COOH}$, es miembro de los ácidos perfluoroalquilo que tienen amplias utilidades comerciales se ha detectado en los seres humanos y animales silvestres (Lauet et al., 2006). Se ha identificado la presencia de PFOA en muestras de tejidos humanos, incluyendo el hígado, riñón, tejido adiposo, cerebro, ganglios, hipófisis, tiroides, gónadas, páncreas, pulmón, músculo esquelético, y en la sangre de sujetos no expuestos ocupacionalmente (Yang et al., 2014).

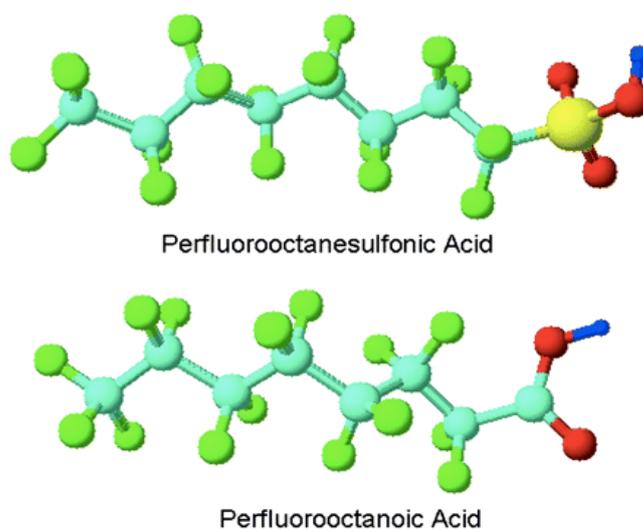


Figura 1. Estructura de PFOA y PFOS (Andersen et al., 2007)

En los últimos años, ha habido una creciente preocupación por los posibles efectos adversos de PFOA en la salud animal y humana. Los estudios de laboratorio han demostrado que el PFOA provoca varios efectos tóxicos, incluyendo hepatotoxicidad, carcinogenicidad, neurotoxicidad, mutagénesis, toxicidad sobre el desarrollo, inmunotoxicidad y genotoxicidad. Los estudios

epidemiológicos también han demostrado que la exposición a PFOA se asocia positivamente con enfermedad cardiovascular, enfermedad renal crónica, enfermedad de la tiroides, y daño hepatocelular (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2016). Se sospecha que los PFCs son carcinógenos y un posible mecanismo de acción es la inducción de estrés oxidante (Eriksen et al., 2010).

En EUA la concentración media de PFCs en suero en la población general de PFOS es de 20.7 ng/mL y para PFOA 4 ng/mL (Calafat et al., 2007), mientras que en personas laboralmente expuestas se encuentra en niveles más altos, 114ng/mL (276µM) (Steenland et al., 2010; Slotkin et al., 2008), y entre 145 a 3490 ng/mL para PFOS (Olsen et al., 2007). Se ha reportado que los niveles en la sangre del cordón umbilical son 4.9 y 1.6 ng/mL para el PFOS y PFOA, respectivamente. En tanto que, en leche materna los niveles de PFOS y PFOA oscilan entre los 45-360 y 47-210 ng/mL, respectivamente (So et al., 2006).

En un intento de evaluar el efecto de los PFCs sobre la calidad de los ovocitos y la tasa de fertilización, se evaluaron los niveles de PFCs en el fluido folicular (FF) y se observó correlación entre los niveles de PFCs en el FF y la tasa de fertilización. Las pacientes que contenían altas concentraciones de PFCs en el FF, tenían significativamente menor tasa de fertilización y número de embriones transferidos, en comparación con el grupo de mujeres del grupo control (Governini et al., 2011).

Estudios en roedores han mostrado que PFOA actúa como promotor de tumores (Jacquet et al., 2012). Se ha demostrado que también puede inducir hepatotoxicidad que implica daño oxidante y respuesta inflamatoria (Yang et al., 2014; Tsuda, 2016). En roedores induce tumores en testículo, hígado y páncreas; donde la dosis más baja a las que se ha observado dicho efecto es de 1 ng/mL en agua potable (Steenland et al., 2010; Panaretakis et al., 2001). El PFOA y el PFOS en ratas y ratones inducen toxicidad durante diferentes etapas del desarrollo, entre los efectos observados se encuentra: reducción del peso fetal, retraso en la osificación de los huesos, anomalías cardíacas, así como, disminución de la

supervivencia neonatal cuando la exposición ocurre *in útero*; otros efectos incluyen la reducción del peso corporal postnatal y retraso en la maduración sexual (Butenhoff et al., 2004).

Se ha informado que PFOA también reduce el peso al nacer en ratones, causa muerte neonatal en ratas, en ratones disminuye la respuesta inmune de células B y células T. Además, en ratas da lugar a la atrofia del bazo y el timo, provoca hepatomegalia, además de que disminuye los niveles de colesterol. Varios estudios experimentales han informado de que los PFC alteran la homeostasis de la hormona tiroidea. Se ha reportado PFOS y PFOA producen un descenso de triyodotironina sérica (T_3) y tiroxina (T_4) en ratas y monos expuestos (Lau *et al.*, 2007). En humanos se ha relacionado con alteraciones en los niveles de las hormonas LH y FSH y la calidad del semen en hombres adultos que fueron expuestos a PFOA (Vested *et al.*, 2013).

Algunos estudios han demostrado que la exposición neonatal a PFOS y PFOA durante el período de desarrollo del cerebro puede causar efectos neurotóxicos en ratones adultos, que se manifiesta como cambios en el comportamiento espontáneo, habituación, memoria y aprendizaje, y altera la susceptibilidad del sistema colinérgico, cuando los ratones se exponen durante el período del desarrollo neonatal del cerebro (Johansson et al., 2008).

Se ha estudiado la toxicología celular de sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA) en la inducción de estrés oxidante y apoptosis en hepatocitos de cultivo primario de tilapia de agua dulce (*Oreochromis niloticus*) (Liu et al., 2007). Por sus propiedades toxicológicas del PFOA, provoca efectos adversos en el hígado, y éste se considera el principal órgano diana para la exposición al PFOA. Se demostró que el PFOA causa agrandamiento del hígado, agrava la hepatitis, induce la proliferación de peroxisomas e interfiere con el metabolismo de los ácidos grasos, el transporte de lípidos y el estado epigenético en el tejido hepático. PFOA también ejerce genotoxicidad en células HepG2

(derivadas de hepatoblastoma humano), probablemente a través de daño oxidativo del ADN inducido por ERO. La exposición crónica de las ratas al PFOA produjo una mayor incidencia de hepatocarcinoma, lo que puede atribuirse a la activación del receptor activado por proliferador de peroxisoma alfa (PPAR α). Además, la apoptosis se describe como un evento crucial en respuesta a la exposición a PFOA en las células del hígado (Huang et al., 2013; Bonekamp et al., 2009)

3 JUSTIFICACIÓN.

De manera continua se producen y liberan en el ambiente grandes cantidades de productos químicos artificiales, dentro de estos encontramos a los PFCs, que son compuestos no degradables que persisten por décadas en el ambiente. Los PFCs son considerados potencialmente tóxicos para mamíferos, en particular los seres humanos se encuentran expuesto de forma casi permanente a estos agentes y poco se conoce de los efectos adversos que puedan causar sobre la salud reproductiva y las células germinales.

Dentro de los PFCs se encuentra el PFOA, el cual es considerado altamente tóxico y se ha relacionado con abortos e infertilidad en las mujeres, por lo anterior existe la necesidad de elucidar la manera de cómo actúan los compuestos perfluorados sobre las funciones reproductivas en hembras. Los modelos *in vitro* permiten llevar a cabo estudios para explicar los posibles mecanismos de acción de los compuestos perfluorados sobre los gametos en condiciones experimentales controladas, permitiendo sugerir la forma en que estos procesos ocurren *in vivo* (Bonilla, 2000), por lo que el este proyecto se diseñó con el interés de investigar cómo los compuestos perfluorados inducen toxicidad celular.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Puede el ácido perfluorooctanoico causar estrés oxidante y muerte celular en ovocitos de ratón cultivados *in vitro*?

5 HIPÓTESIS.

Dado que en células somáticas los compuestos perfluorados han afectado la viabilidad, generado especies reactivas de oxígeno y muerte celular por apoptosis, se plantea que en ovocitos fetales expuestos a PFOA se generará estrés oxidante que llevará a su muerte celular por apoptosis.

6 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto del ácido perfluorooctanoico (PFOA) en la generación de estrés oxidante e inducción de muerte celular en la ovogénesis temprana de ratón, *in vitro*.

7 OBJETIVOS PARTICULARES.

- ❖ Estandarizar la técnica de cultivo de ovarios fetales de ratón.
- ❖ Determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀) de PFOA.
- ❖ Determinar el tipo de muerte celular ocasionada por PFOA durante la ovogénesis temprana en ovocitos fetales de ratón *in vitro*.
- ❖ Determinar si existe generación de estrés oxidante en los ovocitos expuestos a PFOA durante la ovogénesis temprana.

8 MATERIAL Y MÉTODO.

8.1 Material Biológico:

- Ratones hembra *Mus musculus* de la cepa CD1 de seis semanas de edad (Bioterio UAMI).

8.2 Medios de Cultivo:

- Medio para recolección de ovarios fetales:
Medio mínimo esencial (MEM) suplementado con BSA 1mg/ml y penicilina-estreptomicina 100mg/ mL.
- Medio de cultivo de ovocitos:
Medio Waymouth suplementado con suero de caballo 5%, suero fetal de bovino 25% y penicilina-estreptomicina 100 mg/mL.
- Medio DMEM/F12+ α -MEM

8.3 Kits:

- Anexina-V- alexa 569 de Roche.
- Colorante 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína(DCFH-DA) de OxiSelec ROS Assay.

8.4 Extracción de ovarios de ratona

Se utilizaron ovarios fetales de ratón hembra de 19.5 días pos-coito, los cuales fueron disectados en medio MEM para ser cortados en tres fragmentos con agujas finas (G30 ½) bajo el microscopio estereoscópico. Los fragmentos se colocaron en cajas de cultivo celular de 24 pozos con 500 µL de medio de cultivo (Waymouth), se incubaron a 37°C en atmosfera de 5% de CO₂ y humedad a saturación. Después de tres días de cultivo los explantes de ovario se observaron adheridos a la caja de cultivo, se realizó el cambio de medio los siguientes días hasta el día 7 de cultivo se agregó el ácido perfluorooctanoico diluido en DMSO 0.2% en las siguientes concentraciones: 0 (control), 50, 100, 150 y 200 µM correspondientes a cada pozo durante un periodo de 24 h.

Transcurrido los siete días de cultivo se obtuvieron un gran número de ovocitos que se encontraban en estadio de vesícula germinal con un tamaño aproximado de entre 50 y 70 µm y se contaron; los ovocitos adheridos al explante se consideraron vivo.

8.5 Determinación de la CL₅₀

Para determinar la CL₅₀, los ovarios fetales en cultivo (ovogénesis temprana) fueron incubados durante 24 h, con diferentes concentraciones de PFOA abarcando los intervalos de concentración 50, 100 y 150 µM. Para la evaluación de la viabilidad, se utilizó el MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), el cual nos permitió distinguir entre una célula viva y muerta, se consideró vivos a los ovocitos que presentaron una coloración violeta y muertos a los incoloros. La CL₅₀ se calculó realizó una regresión lineal entre la concentración de tóxico (variable independiente) y la respuesta de los ovocitos, la viabilidad (variable dependiente).

8.6 Determinación de especies reactivas de oxígeno intracelular.

Se cultivaron ovarios fetales de ratón completos de 7 días de cultivo, los cuales fueron expuestos a PFOA a concentraciones de 28.2 μM y 112.86 μM por 24h, transcurrido el tiempo se realizó un lavado para retirar el exceso de medio de cultivo, se realizó un corte transversal y se colocaron en 1mL de medio MEM sin rojo fenol con diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFHDA), los ovarios se incubaron durante 30 minutos, se puso un control positivo con H_2O_2 a 50 μM y se realizó un lavado para retirar el exceso de DCFHDA, una vez lavados se montaron en medio de montaje y se realizaron cortes de 6 micras en el criostato, los cortes de ovario fetal se montaron el portaobjetos y se analizaron en el microscopio de epifluorescencia Zeiss, modelo Axyostar Pluscon excitación a 488nm.

8.7 Análisis del tipo de muerte celular

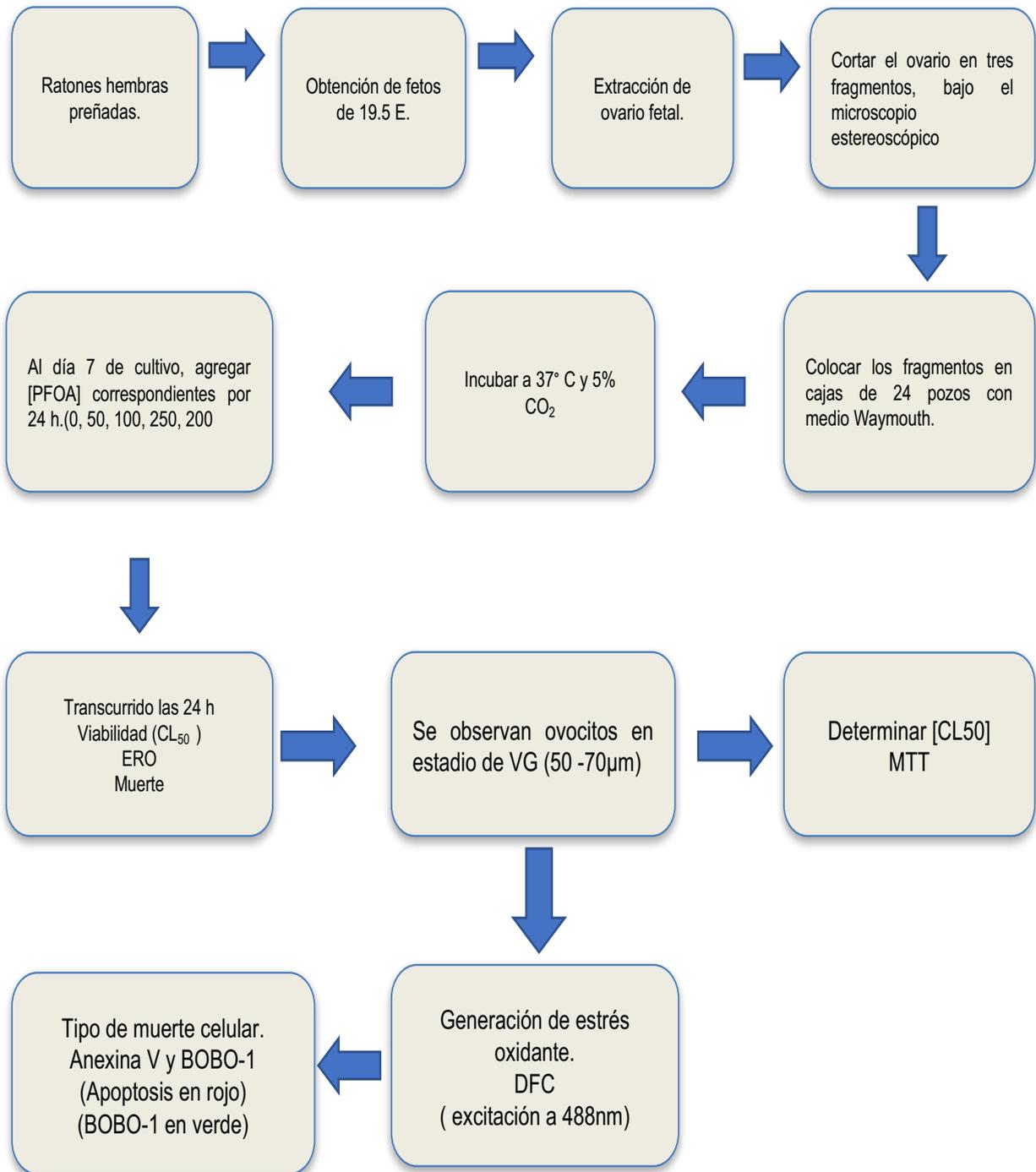
Después de la separación de los ovocitos del explante de ovario por medio de pipeteo constante se empleó el ensayo de muerte celular, los ovocitos se colocaron en una gota de 250 μl de solución de Hanks, en donde se resuspendieron de 2 a 3 veces para retirar el exceso de medio de cultivo. Estos ovocitos se colocaron en una caja de Petri con el 500 μl de Anexina-V (10 μl de Anexina-V, 10 μl de BOBO-1, 10 μl Hoechst(45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 470 μl de buffer de incubación. La caja se cubrió con papel aluminio y se dejó durante 20 minutos en la oscuridad. Transcurrido el tiempo, los ovocitos se lavaron en gotas de 500 μl de solución de Hanks, donde se resuspendieron de 2 a 3 veces para retirar el exceso de Anexina-V, BOBO-1 y Hoechst, y los ovocitos se colocaron en portaobjetos cóncavos y se observaron en el microscopio de tecnología LED(ZOE), utilizando los filtros de fluorescencia con rangos de excitación para luz ultravioletas (488nm).

8.8 Análisis estadístico.

Para comparar el efecto de las diferentes concentraciones de PFOA en la viabilidad de los ovocitos fetales de ratón, se realizó un análisis estadístico de comparación múltiple y una prueba de Fisher para la comparación de grupos, los datos fueron normalizados. Todos los resultados se reportan como la media \pm error estándar (E.E)

Las diferencias con valor de $p < 0.05$ se consideraron significativas. Los experimentos se realizaron al menos en tres ensayos separados y cada uno de ellos por triplicado.

8.9 Diseño experimental.



9 RESULTADOS

Se estandarizó la técnica de cultivo de fragmentos de ovario de ratón cultivados *in vitro*, logrando que éstos se adhirieran a la caja de cultivo y proliferaran las células en el explante de ovario. En la figura 2 se observa: a) el fragmento de ovario fetal de 5 días de cultivo adherido a la placa de cultivo. En b, c y d) muestran los explantes de ovario fetal de ratón de 7 días de cultivo los cuales se encuentran expandidos y con un desarrollo adecuado de ovocitos.

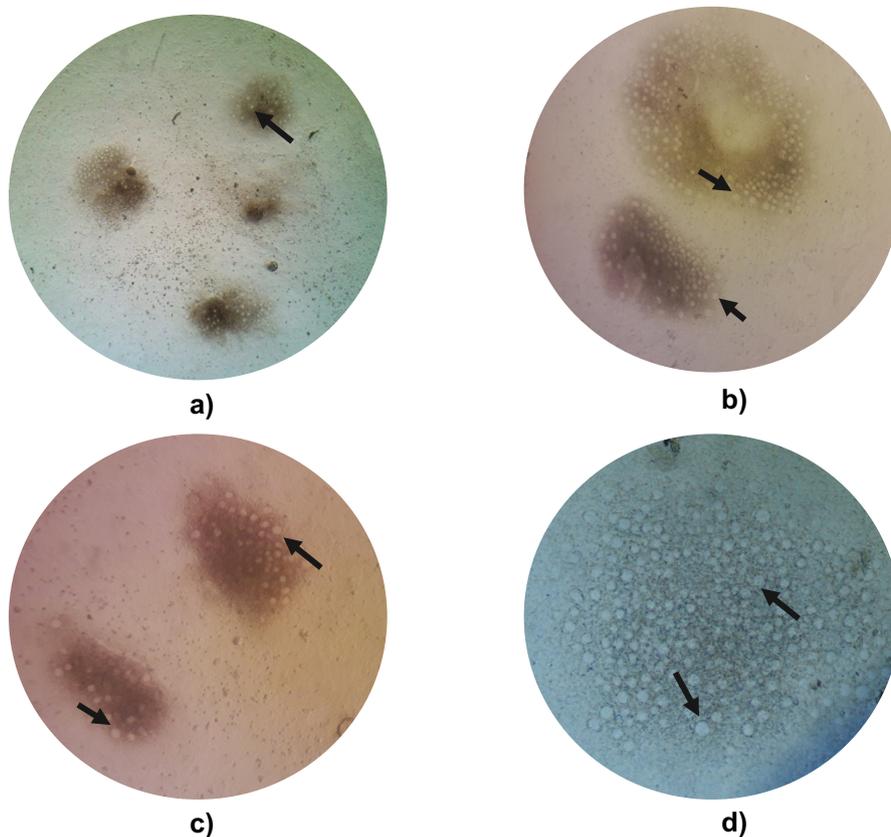


Figura 2. a) Explante de ovario fetal de ratón de 5 días de cultivo a 100X. En b, c, y d) Explante de ovario fetal de ratón de 7 días de cultivo de 19.5E a 200X. En las figuras se observan los ovocitos fetales presentes en los fragmentos de ovario, las flechas indican los ovocitos.

9.1 Efecto del PFOA sobre la viabilidad de ovocitos fetales *in vitro*.

Se realizaron un total de siete experimentos para el ensayo de viabilidad en los explantes de ovario fetal de ratón, empleando las concentraciones de 50 μM , 100 μM y 150 μM . Los resultados mostraron un decremento, en el número de ovocitos dependiente de la concentración expuestos al PFOA por un periodo de 24 h al ser comparados con el control (Figura. 3).

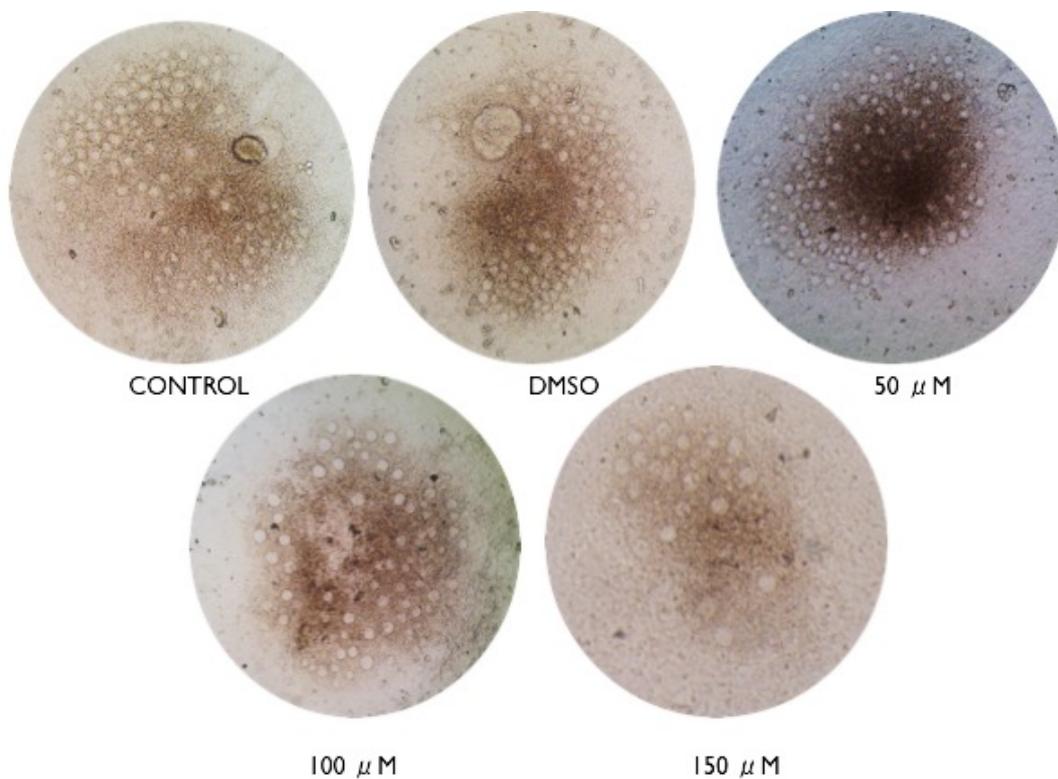
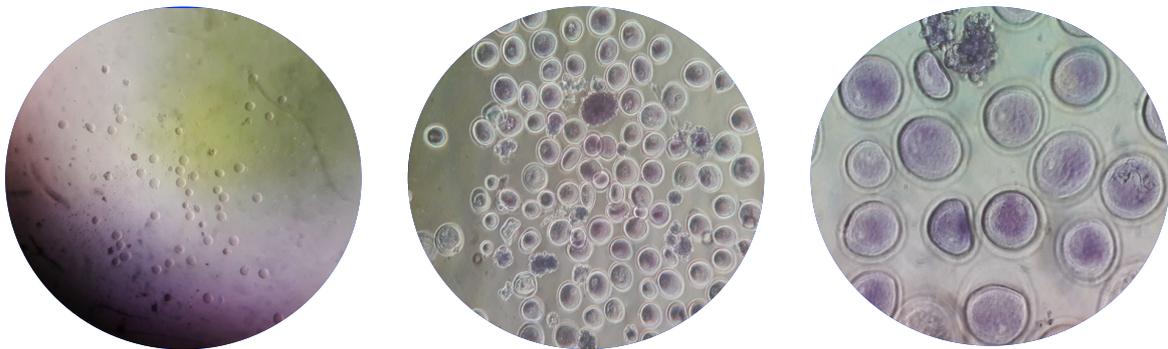


Figura 3. Explante de ovario de ratón tratados con PFOA. Control (sin PFOA), DMSO, 50, 100 y 150 μM de PFOA 200X se observa una disminución de los ovocitos en las concentraciones más altas.

Con el fin de estimar la sobrevivencia presente en los cultivos de ovario fetal de ratón se realizó la tinción con MTT, método basado en la reducción de 3-(4.5-dimeltiazol-2-yl)-2.5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables.

En el ensayo de viabilidad se observan los ovocitos teñidos de morado, el cual es un indicativo de que los ovocitos están vivos, y se logra ver el estadio de vesícula germinal, que se caracteriza por presentar un núcleo grande.



a) 100X

b) 200X

c) 400X

Figura 4. Ovocitos de ratón separados del fragmento de ovario en estadio de vesícula germinal, a) Ovocitos sin teñir a 100X, b) Ovocitos teñidos con MMT a 200X C) Ovocitos teñidos con MTT en vesícula germinal a 400X.

9.2 Ensayo de viabilidad

Se realizaron seis ensayos para determinar el efecto en la viabilidad y determinar la CL₅₀ en los cultivos de ovocitos de siete días de cultivo, expuestos a diferentes concentraciones, Control, DMSO, 50, 100 y 150 μM del PFOA. En la Figura 5 se observa las diferencias significativas entre los tratamientos de 100 y 150 μM con respecto al control.

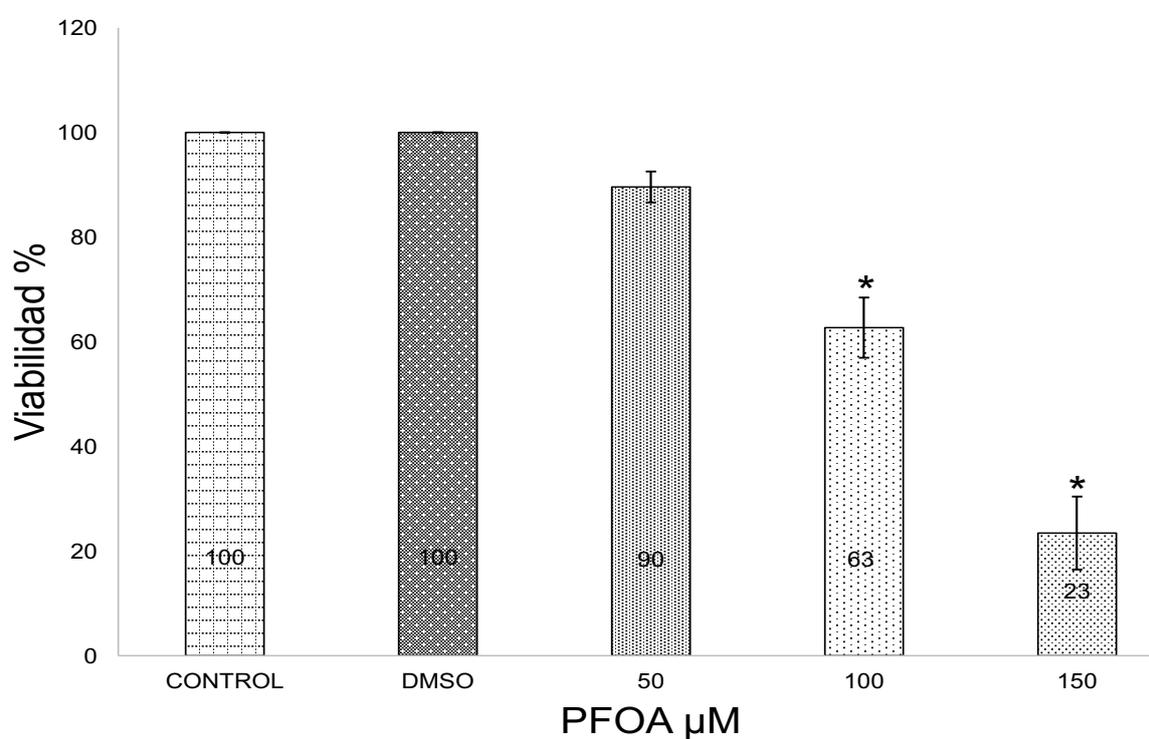


Figura 5. Efecto en la viabilidad de ovocitos de ratón *in vitro* expuestos a PFOA durante un periodo de 24h. Los valores representan las medias \pm E.E de seis experimentos independientes. * $P < 0.05$

9.3 Concentración letal media (CL₅₀)

El coeficiente de correlación de lineal, indicó que hubo una correlación negativa entre las concentraciones y la viabilidad ($R^2=0.80883$). La CL₅₀, calculada a partir de seis experimentos fue 112.86 μM (Figura 6).

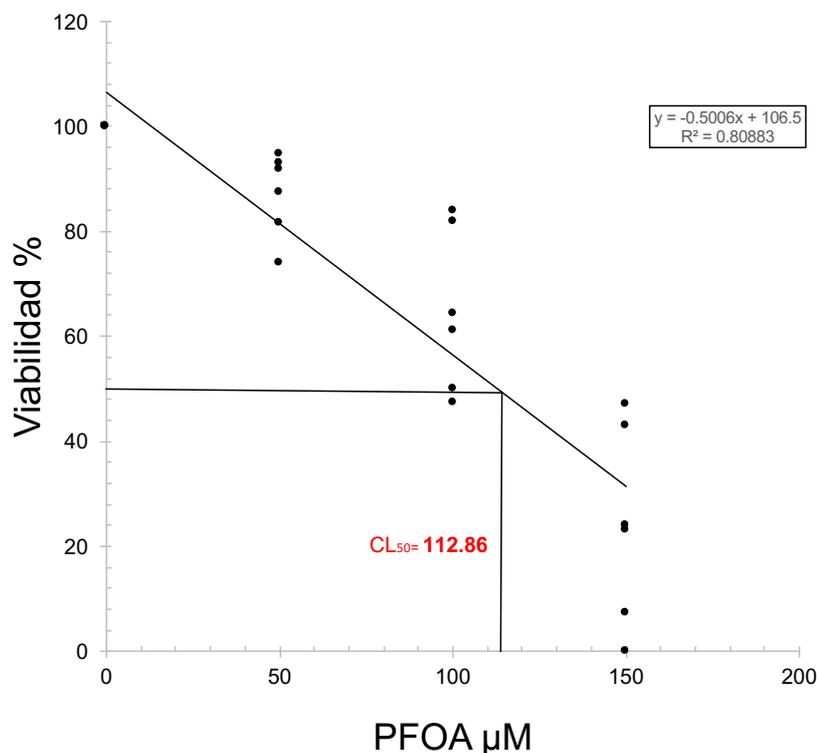


Figura 6. Viabilidad de ovocitos de ratón expuestos a diferentes concentraciones de PFOA durante 24h. Se observa una correlación negativa en relación a las concentraciones de PFOA.

9.4 Generación de estrés oxidante en los ovocitos expuestos a PFOA durante la ovogénesis temprana.

Para evaluar la generación de la ERO producidas por el PFOA en los cortes de ovario fetal expuestos al perfluorado, se realizó el experimento por triplicado. A partir de la CL_{50} ($112.86\mu\text{M}$) se emplearon las siguientes concentraciones 0, 28 y $112.86\mu\text{M}$ de PFOA, utilizando H_2O_2 $50\mu\text{M}$ como control positivo, el cual genera estrés oxidante. Una vez estandarizada la técnica de tinción con diacetato de diclorofluoresceína (DCFHDA), los resultados mostraron que la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ERO.

Los cortes de ovario fetal muestran un incremento en la fluorescencia al ser incubados con PFOA ya que la concentración de especies reactivas es proporcional a la fluorescencia (Figura 7).

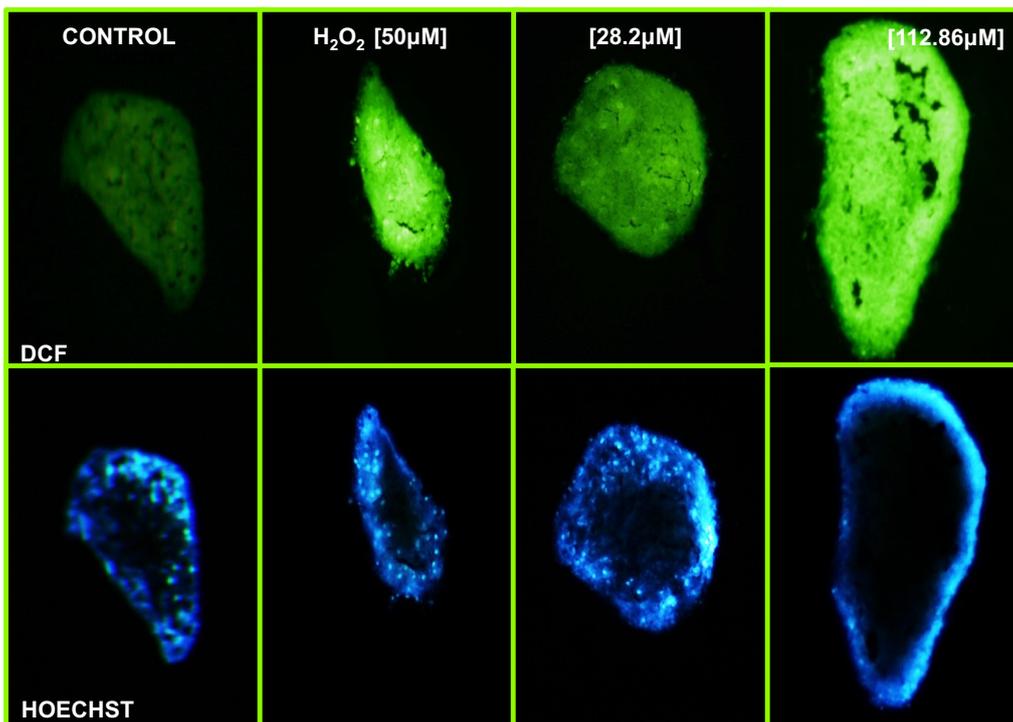


Figura 7. Generación de ERO en ovarios fetales de ratón expuestos a diferentes concentraciones de PFOA, 100X, la figura muestra los cortes de ovario fetal donde se aprecia un incremento en la fluorescencia presente en éstos, siendo el control positivo H_2O_2 donde hay un incremento mayor de fluorescencia, seguido de nuestra concentración CL_{50} ($112.8\mu\text{M}$), lo que indica una mayor generación de ERO

9.5 Cuantificación de ERO.

Para la cuantificación de las ERO, se midió la fluorescencia presente en los cortes de ovario fetal expuestos al PFOA con las concentraciones de 28, 112.86 μ M y H₂O₂ (50 μ M) después de 24 h. La cuantificación se realizó con el programa ZEN (Carl Zeiss Microscopy) el cual mide el área del corte y la intensidad de la fluorescencia presente en la muestra. En el experimento se muestra que los ovarios expuestos a 28 μ M de PFOA presentan un incremento en la generación de ERO, aunque éste no mostro diferencia significativa con respecto al control, mientras que en los ovarios expuestos a 112.86 μ M de PFOA, así como en el control positivo con H₂O₂ (50 μ M), se presenta un incremento significativo con respecto al control negativo ($p < 0.05$) (Figura 8).

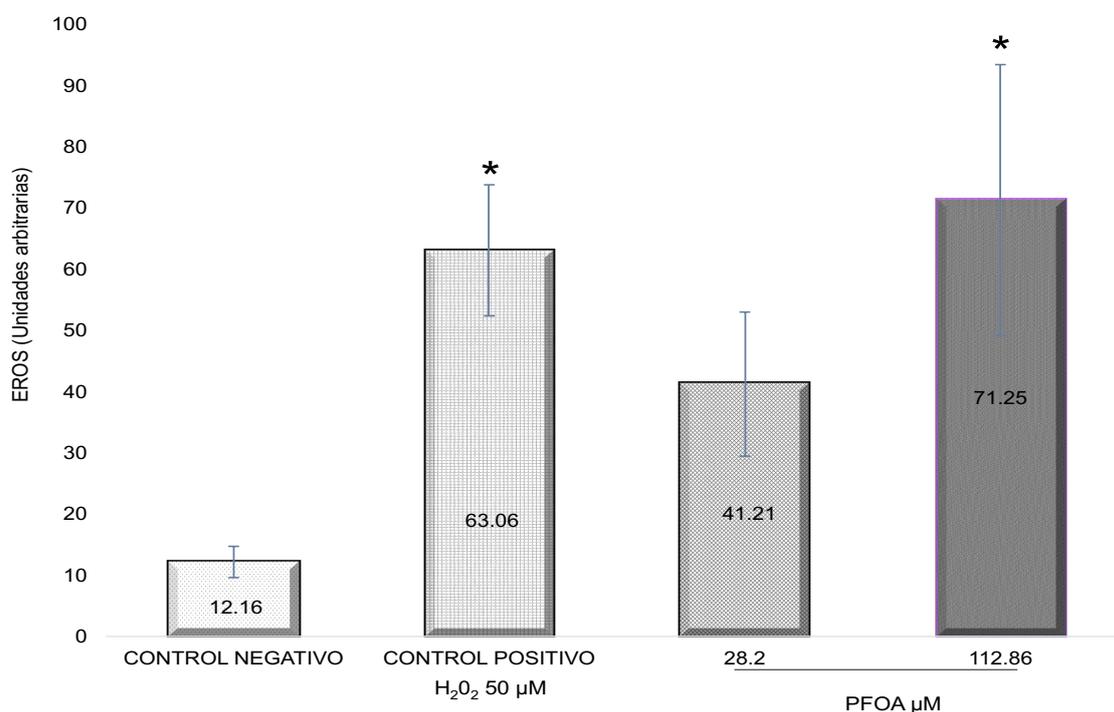


Figura 8. Cuantificación de ERO en ovarios de ratón expuestos a PFOA por 24 h. Los valores representan las medias \pm E.E. * Muestra diferencias significativas. Fisher. $P < 0.05$. $n = 3$.

9.6 Tipo de muerte celular ocasionada por PFOA durante la ovogénesis temprana en ovocitos fetales de ratón *in vitro*.

En los ensayos de muerte celular en cultivos de 7 días, éstos fueron tratados con el PFOA por 24h con concentraciones subletales, los resultados muestran que en los cultivos de explante de ovario fetal hay muerte celular tanto apoptótica como necrótica en nuestro control, lo cual se produce de manera normal, pero en el tratamiento de 28.2 μ M se presenta un mayor número de células en apoptosis con respecto al control, y en la concentración de 112.86 μ M (CL₅₀) hay un incremento drástico en la cantidad de células que presentan apoptosis (rojo) o necrosis (verde) (Figura 9).

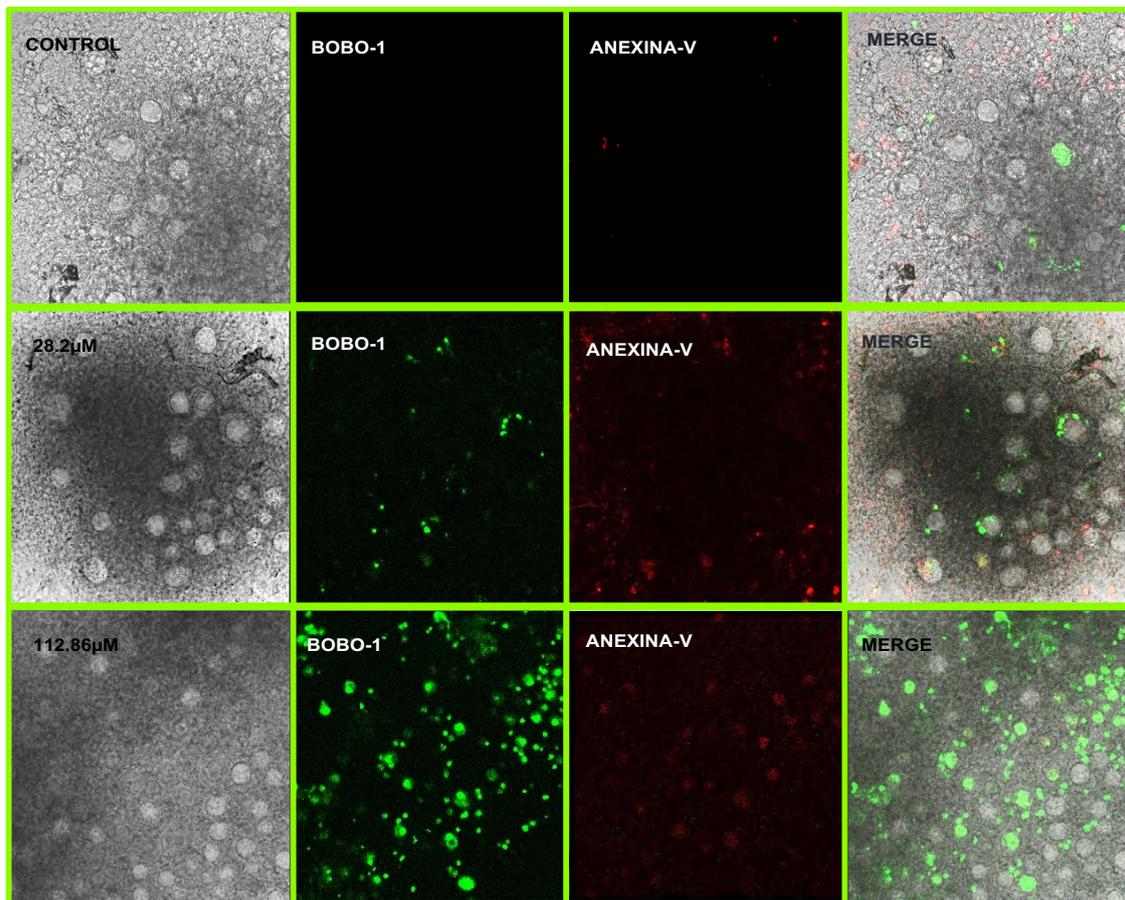


Figura 9 Explante de ovario de siete días de cultivo, teñidos con Anexina (Rojo) y BOBO 1 (Verde), expuestos a concentraciones subletales de PFOA. 200X.

9.7 Ensayos de muerte celular sobre los ovocitos fetales de ratón.

Para estos experimentos, los ovarios fetales de ratón fueron expuestos a PFOA y los ovocitos se aislaron de los explantes de ovario para evaluar el tipo de muerte celular directamente en los ovocitos. Los resultados muestran que los ovocitos expuestos a la concentración subletal de $28\mu\text{M}$ de PFOA no presentan un incremento marcado en el número de ovocitos con apoptosis y necrosis, lo que coincide con ensayos previos en las células somáticas del explante de ovario, mientras que en los ovocitos expuestos a $112.86\mu\text{M}$ de PFOA se incrementó el número de ovocitos que presentaron tanto necrosis como apoptosis con respecto al control (Figura 10).

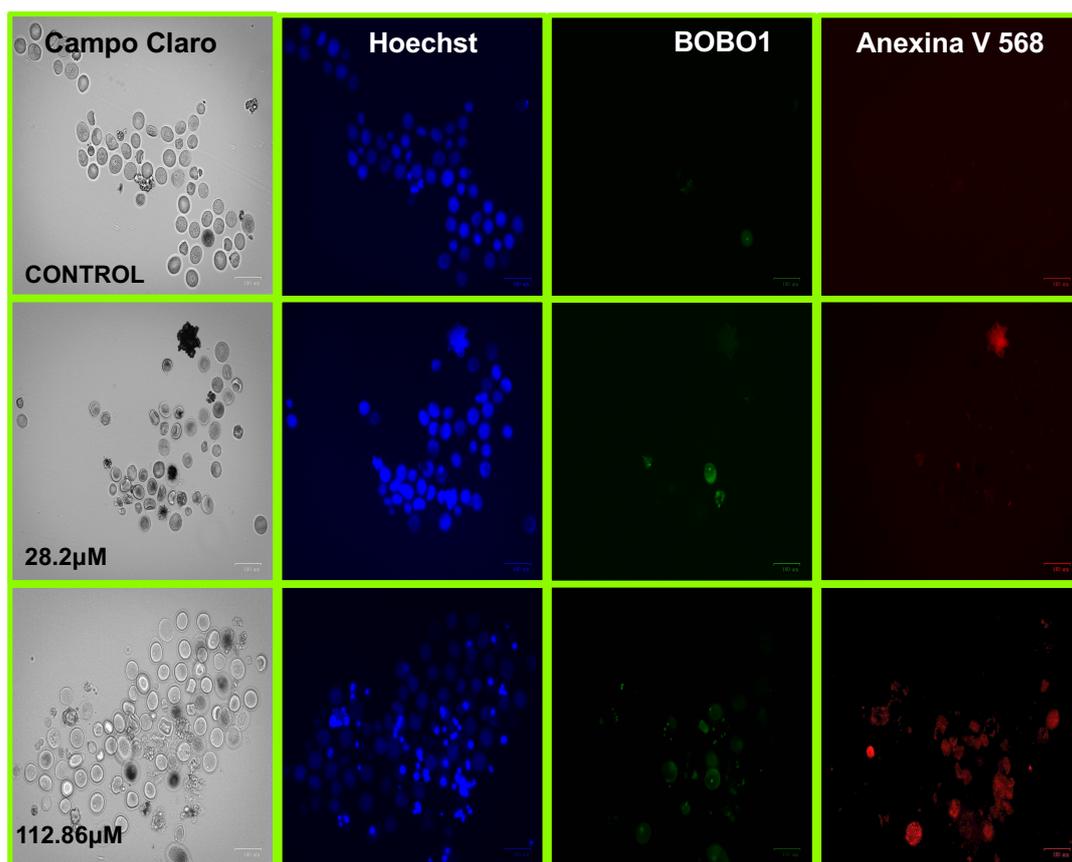


Figura 10. En gris observamos los ovocitos en campo claro, ovocitos teñidos en verde con BOBO-1 (Necrosis), ovocitos teñidos en rojo con Anexina-V 568 (Apoptosis) y Hoechst en azul.

Realizando un análisis de los datos, se observa que hay diferencias significativas de los tratamientos de 28.2 μ M y 112.86 μ M con respecto al control, ya que en estos tratamientos el número de ovocitos con necrosis y apoptosis se correlaciona con la concentración de PFOA (Figura 11).

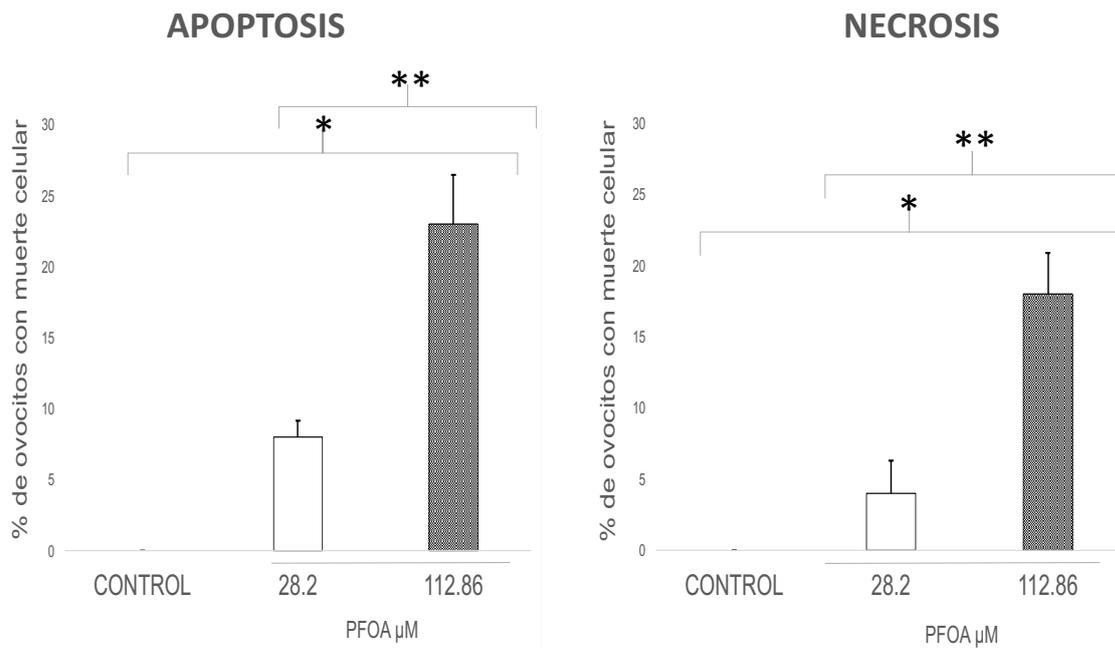


Figura 11. Muerte celular en ovocitos fetales de ratón expuestos durante 24h a PFOA. Los valores representan las medias \pm E.E. * Muestra diferencias significativas. Fisher. $P < 0.05$. $n = 3$. En la figura se observa cómo se incrementa el porcentaje de muerte en los ovocitos de una manera dependiente de la concentración.

10 DISCUSIÓN.

Debido a que los PFOA se ha detectado en diferentes órganos como hígado, riñón, tejido adiposo, cerebro, ganglios, hipófisis, tiroides, gónadas, páncreas, pulmón, músculo esquelético, y en la sangre de sujetos no expuestos ocupacionalmente (Yang et al., 2014; Governini et al., 2011) y a que se ha relacionado con alteraciones en la reproducción, el presente estudio evaluó el efecto en la viabilidad, la generación de estrés oxidante y muerte celular.

En la actualidad no existen reporte sobre el efecto del PFOA sobre los parámetros de viabilidad, apoptosis y generación de ERO en cultivos de explantes de ovario fetal de ratón.

Las concentraciones evaluadas en el este estudio fueron 50, 100, 150 y 200 μM ; durante el estudio se descartó la última concentración ya que ésta abatió totalmente el número de ovocitos presentes en el explante de ovario fetal de ratón.

Después de la evaluación de cada una de las concentraciones del PFOA en los cultivos de explante de ovario fetal, los resultados indicaron una tendencia en la disminución de la viabilidad dependiente de la concentración, siendo 100 y 150 μM , las concentraciones donde los porcentajes de la viabilidad disminuyeron considerablemente en un 63% y 23% respectivamente en comparación con el grupo control, la CL_{50} fue 112.86 μM , lo que indica la alta toxicidad de dicho compuesto en células germinales, La CL_{50} es un parámetro importante de referencia ya que existen reportes con individuos con concentraciones de 9.66 μM (4ng/mL) en plasma sanguíneo (Calafat et al., 2007). Sin embargo, Slotkin y colaboradores en el 2008^a reportaron una concentración de 276 μM (114 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Son pocos los reportes sobre el efecto de PFCs en los gametos, uno de estos estudios fue realizado por Domínguez et al 2016, en el que el objetivo del estudio fue determinar los efectos de PFOS durante la maduración *in vitro* de ovocitos de cerdo. Los resultados indican que el PFOS fue capaz de afectar la viabilidad de los ovocitos ($CL_{50}= 32\mu M$) y la maduración ($CL_{50}= 22\mu M$). En Otro estudio se observó una disminución de la tasa de fertilización y un menor número de embriones transferidos en mujeres que presentaron $31.39 \mu M$ (13 ng/ mL) de compuestos perfluorados en fluido folicular (Governini et al., 2011).

Las concentraciones empleadas en este estudio fueron de $28 \mu M$ y $112.86 \mu M$ ($1/4 CL_{50}$ y CL_{50} respectivamente) las cuales fueron inferiores a las reportadas por Slotkin et al 2008^{ab}, en la línea celular PC12 para analizar la toxicidad de PFOA y PFOS en concentraciones que van desde 10-250 μM por 24h, observaron una disminución estadísticamente significativa en las concentraciones de 100 y 250 μM para PFOA, en comparación con PFOS la cual no presentó diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las concentraciones evaluadas 10, 50, 100 y 250 μM .

Florentin et al. (2011) evaluaron los efectos citotóxicos y genotóxicos de PFOA y PFOS células HepG2 de humanos expuestas a 1 o 24 h. Sus resultados muestran un efecto citotóxico para ambos compuestos después de 24 h a partir de una concentración de 200 μM y 300 μM , disminuyendo la viabilidad en un 14,6% y - 51,2%, respectivamente.

Los estudios anteriores muestran que las células germinales en mamíferos son más susceptibles a los efectos adversos del PFOA, ya que se requirieron concentraciones menores para afectar la viabilidad en comparación con células somáticas donde se requieren de concentraciones superiores para observar algún efecto adverso, sin embargo el estudio realizado por Liu et al., (2007) demostró que las células somáticas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) fueron más

susceptibles a PFOA (0, 1, 5, 15 y 30 mg/L= 0.002, 0.012, 0.036 y 0.072 μM) o PFOS (0, 1, 5, 15 y 30 mg/L= 0.0019, 0.0099, 0.0299 y 0.0599 μM).

En la actualidad existen reportes en donde se demuestra que PFOA genera estrés oxidante en células somáticas, pero no existen reportes que demuestren el efecto de este perfluorado en células germinales. En el presente estudio se analizó la inducción de estrés oxidante por PFOA en ovario fetal de ratón durante la gametogénesis temprana, nuestros resultados muestran un aumento significativo de las ERO en los cortes de ovario fetal, este incremento es dependiente de la concentración de PFOA.

Se ha informado de la toxicidad del PFOA se debe en parte a la generación de estrés oxidante producido por el exceso de ERO en la mitocondria, que tienen un papel clave como orgánulo diana para los mecanismos de toxicidad de xenobióticos, tales como metales pesados y productos químicos como el PFOA (Mashayekhi et al., 2015)

Las mitocondrias son la principal fuente de ERO, el exceso de ellas puede causar un daño en estas alterando el potencial de membrana, produciendo un cambio en la permeabilidad membrana, desencadenando la liberación del citocromo c, lo que conlleva a la inhibición de la respiración y la producción de ERO (Panaretakis et al., 2001)

Nuestros resultados coinciden con los reportados por Eriksen et al., (2010); Ellos examinaron la capacidad del PFOA para generar ERO e inducir daño oxidante del ADN en células HepG2 humanas expuestas a 100 y 400 μM PFOA durante 24 h. La exposición al PFOA causó un aumento de ERO de manera dependiente de la dosis en células HepG2, donde PFOA induce un aumento de 1.52 veces en la producción de ERO. Nuestros resultados muestran un incremento de la generación de ERO en los cortes de ovario desde la concentración de 28.2 μM , el cual es mucho más pronunciado en la concentración $\text{CL}_{50} = 112.86 \mu\text{M}$,

nuevamente reafirmando que las células germinales son más susceptibles a el PFOA ya que se requieren de concentraciones menores para observar la generación de ERO en comparación con la célula somática expuestas a concentraciones superiores reportadas en otros estudios.

Liu et al (2007) estudió la toxicología celular de PFOS y PFOA, la inducción de estrés oxidante en hepatocitos de cultivo primario de tilapia de agua dulce (*Oreochromis niloticus*), en las concentraciones de (1, 5, 15 y 30 mg/L) durante 24 h. Observaron una Inducción significativa de ERO, acompañado por aumento en la actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR). Un aumento dependiente de la dosis en el nivel de peroxidación lipídica (LPO) (malondialdehído, MDA) con PFOA, mientras que con PFOS se mantuvo sin cambios LPO en las mismas concentraciones.

Yang et al. (2014) observó que perfluorados de cadena más larga como ácido perfluorononanoico (PFNA) y ácido perfluorododecanoico (PFDA) a concentraciones de 2.5-10 mg/kg fueron capaces de inducir un aumento significativo en los niveles de H₂O₂ y MDA, afectando la actividad de la superóxido dismutasa y catalasa en el hígado de las ratas; MDA y H₂O₂ se pueden utilizar como medidas indirectas de la lipoperoxidación y lesiones celulares. PFOA también fue capaz de inducir la formación de ERO en cultivos primarios de cardiomiocitos de embriones de pollo expuestos en un intervalo de 1 a 36 h utilizando concentraciones que oscilan entre 50 y 100 µg/mL, observándose diferencias significativas a partir de 50 µg/mL posterior a la primera hora de exposición (Jiang et al 2016).

En los últimos años se ha reconocido cada vez más la importancia de las ERO y el estrés oxidante en la toxicidad ovárica por diversos estímulos. Existen fuertes evidencias de que las ERO está involucradas en el inicio de la apoptosis en folículos antrales al ser expuestos a diversos xenobioticos incluyendo los ftalatos, metoxicloro y radiación ionizante (Tiwari et al., 2016; Zhang et al., 2014).

La apoptosis es un importante proceso celular que desempeña un papel importante en la determinación del destino de la célula. PFOA ha sido ampliamente utilizado para inducir estrés oxidativo en el cultivo de células somáticas en diferentes modelos animales. Sin embargo, no existen estudios sobre la exposición del PFOA durante la gametogénesis en animales. Es importante investigar los efectos tóxicos del PFOA en el ovario porque es un órgano crítico para la función reproductiva en las hembras. Por otra parte, el estrés oxidante se ha considerado como uno de los factores más importantes que conducen a la apoptosis y atresia folicular.

En este estudio, se utilizó PFOA para establecer el tipo de muerte celular que induce este compuesto en explantes de ovario fetal y en ovocitos fetales de ratón. Nuestros datos muestran un aumento significativo en el número de células con apoptosis y necrosis en el explante de ovario, el cual es dependiente de la concentración, observándose muerte celular desde la concentración de 28.2 μ M equivalente a $\frac{1}{4}$ de la CL₅₀, y 112.86 μ M (CL₅₀).

En cuanto al experimento realizado en los ovocitos fetales expuestos por 24 h al PFOA, concuerda con lo observado en las células de tejido ovárico (en el explante), los porcentajes de muerte celular se incrementan significativamente dependiendo de la dosis, nuestros resultados indican que en la concentración de 28.2 μ M, hay un 8% de apoptosis y 4% de necrosis, lo cual indica que el 88% de los ovocitos están vivos, Mientras que en la 112.86 μ M (CL₅₀) los porcentajes aumentaron: 23% apoptosis, 18% de necrosis y 59% de ovocitos vivos.

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios realizados in vitro donde se examinaron los efectos de la exposición de timocitos (linfocitos T inmaduros) y esplenocitos al PFOA. Los estudios mostraron apoptosis en ambos tipos celulares después de 8 o 24 h de cultivo en concentraciones de (50, 100 o 200 μ M) de PFOA (Yang et al. 2000).

En el ovocito las células de la granulosa deciden el destino de éste, dentro del microambiente folicular. La privación de los ovocitos a diversas moléculas de señalización, factores de supervivencia y factores de crecimiento de las células de la granulosa desencadenan la susceptibilidad de los ovocitos hacia la apoptosis (Tiwari et al., 2015).

Diversos estudios demuestran que los compuestos perfluorados son capaces de generar muerte en células somáticas. Hu y Hu (2009) observaron un aumento no significativo de la apoptosis dependiente de la dosis en las células HepG2 humano cultivadas con PFOA, sus resultados también muestran que a exposición a PFOA no cambió la expresión de, Bax, o caspasa-3 en células HepG2. La expresión de Bcl-2 fue regulada negativamente y la caspasa-9 se reguló positivamente de forma dependiente de la dosis en células HepG2 después de la exposición a 50-200 $\mu\text{mol/L}$ de PFOA. Sin embargo, existe otros reportes que indican lo contrario, Huang et al. (2013) estudiaron la capacidad del PFOA para induce apoptosis a través de la vía mitocondrial dependiente de p53 en células hepáticas humanas, sus resultados mostraron que PFOA indujo significativamente la producción de ERO de una manera dosis dependiente cuando se expusieron a 25 y 50 mg/L de PFOA por 72 h. Sus resultados también muestran un aumento en la expresión de las proteínas involucradas en la apoptosis sobre expresando proteína pro-apoptóticas Bax y disminuyendo la expresión de Bcl-2, Caspasa 3 y 9. Estos resultados son apoyados por otros autores como Liu (2007) el cual reportó la inducción de la apoptosis en hepatocitos de cultivo primario de tilapia de agua dulce, mostrando la activación de la caspasa-3, -8, -9 tras la exposición a PFOS y PFOA. Los resultados demostraron que PFOS y PFOA son capaces de producir estrés oxidante e inducir la apoptosis con implicación de las caspasas en hepatocitos de cultivo primario de tilapia.

Se sabe que la apoptosis en los ovocitos de mamíferos involucra las vías mediadas por las mitocondrias tanto como la vía intrínseca como la extrínseca. El aumento del estrés oxidante es uno de los principales factores que inducen la apoptosis en ovocito. Varios genes, tal como se ha descrito anteriormente, siguen

las vías mediadas por las mitocondrias o mediadas por los receptores de la muerte y algunos de ellos vincula estas dos vías para inducir la apoptosis en ovocitos (Tiwari et al., 2015).

El desarrollo de células germinales en el ovario fetal también ha demostrado ser sensible a los tóxicos que induce el estrés oxidante que deteriora directa o indirectamente la calidad del ovocito mediante la inducción de la apoptosis de las células de la granulosa, así como los ovocitos (Tiwari et al., 2016; Zhang et al., 2014).

Estos estudios amplían aún más la investigación del efecto del daño ovárico inducido por el estrés oxidativo en la gametogénesis temprana y sus posibles mecanismos de acción.

11 CONCLUSIONES.

- El PFOA afecta la viabilidad de los ovocitos.
- La concentración letal media es de 112.86 μM
- Concentraciones subletales de PFOA y la CL_{50} incrementaron la concentración de ERO en cortes de ovario fetal expuestos.
- Las células germinales son mucho más sensibles a la presencia del PFOA que las células somáticas de otros tejidos, ya que se sólo se requirió de una concentración de 28.2 μM para que las células somáticas del explante de ovario, así como el propio ovocito presentaran muerte celular apoptótica como necrótica.

12 PERSPECTIVAS

- Determinar si el PFOA genera expresión y actividad de las enzimas antioxidantes involucradas en la defensa de la célula (GPX, CAT, SOD1).
- Determinar si existe generación de estrés oxidante en los ovocitos de ratón expuestos al PFOA.
- Identificar cuál es la vía por la que está ocurriendo la muerte celular.
- Determinar si existe lipoperoxidación en los ovocitos expuestos a PFOA.
- Determinar si el PFOA genera daño al DNA de los ovocitos.

13 BIBLIOGRAFÍA.

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

Agarwal, A., Durairajanayagam, D., and du Plessis, S.S. (2014). Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12, 112.

Andersen, M.E., Butenhoff, J.L., Chang, S.-C., Farrar, D.G., Kennedy, G.L., Lau, C., Olsen, G.W., Seed, J., and Wallace, K.B. (2007). Perfluoroalkyl Acids and Related Chemistries--Toxicokinetics and Modes of Action. *Toxicological Sciences* 102, 3–14.

Baumber, J., Ball, B., Gravance, C., Medina, V. Davies, M. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl.* 21: 895-902.

Bhattacharya, P., and Keating, A.F. (2011). Ovarian metabolism of xenobiotics. *Experimental Biology and Medicine* 236, 765–771.

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., and Crowe, S.E. (2014). Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews* 94, 329–354.

Bonilla, E. (2000). Expresión génica diferencial en oocitos en ensayos de toxicología. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.

- Bonekamp, N.A., Völkl, A., Fahimi, H.D., and Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *BioFactors*35:346–355.
- Butenhoff, J.L., Kennedy, G.L., Frame, S.R., O'Connor, J.C., and York, R.G. (2004). The reproductive toxicology of ammonium perfluorooctanoate (APFO) in the rat. *Toxicology*196, 95–116.
- Calafat, A.M., Wong, L.-Y., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., and Needham, L.L. (2007). Polyfluoroalkyl Chemicals in the U.S. Population: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004 and Comparisons with NHANES 1999–2000. *Environmental Health Perspectives*115, 1596–1602.
- Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*48, 749–762.
- Connie, J., Kappeler, M., Hoyer, P., Devine, P. (2011). Xenobiotic effects on ovarian preantral follicles. *BiolReprod.* 85: 871–883.
- Dai, X.-X., Duan, X., Cui, X.-S., Kim, N.-H., Xiong, B., and Sun, S.-C. (2015). Melamine Induces Oxidative Stress in Mouse Ovary. *PLOS ONE* 10, e0142564.
- Desouza ,C.,Fonseca,R. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptors as stimulants of angiogenesis in cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.*; 2: 165–172.
- Devine, P.J., Perreault, S.D., and Luderer, U. (2012). Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity. *Biology of Reproduction*86, 27–27.
- Eppig, J. (2005). Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays* 13: 569–574.

Eriksen, K.T., Raaschou-Nielsen, O., Sørensen, M., Roursgaard, M., Loft, S., and Møller, P. (2010). Genotoxic potential of the perfluorinated chemicals PFOA, PFOS, PFBS, PFNA and PFHxA in human HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 700, 39–43.

Fei, C., McLaughlin, K., Tarone, R., Olsen, J. (2007). Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Environ Health Perspect.* 11: 1677–1682.

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

Ferrer, J. (2014). Papel del receptor α activado por proliferadores de peroxisoma en la fisiopatología del sistema cardiovascular. CENIC, *Ciencias biológicas* 45.

Florentin, A., Deblonde, T., Diguio, N., Hautemaniere, A., and Hartemann, P. (2011). Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: Cytotoxicity but no genotoxicity? *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 493–499.

Flores, F., Rosas, C., Romano, M., Pérez, M. (2005). Apoptosis and follicular atresia: an essential binomial for ovarian development. *Vet Méx.* 36(1).

Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O., and Samali, A. (2010). Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology* 2010, 1–23.

Galluzzi, L., Bravo, J., Vitale, I., Aaronson, S., Abrams, J., Adam, D., Alnemri, E., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico, M., Baehrecke, E., Bazan, N., Bertrand, M., Bianchi, K., Blagosklonny, M., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D., Brenner,

C., Campanella, M., Candi ,E., Cecconi ,F., Chan, F., Chandel, N., Cheng, E., Chipuk, J., Cidlowski, J., Ciechanover, A., Dawson, T., Dawson,V., De Laurenzi ,V., De Maria, R., Debatin, K., Di, N.,Dixit, V., Dynlacht, B., El-Deiry ,W., Fimia, G., Flavell, R., Fulda, S., 48, Garrido, C., Gougeon, M., Green,D., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick ,J., Hengartner, M., Ichijo ,H., Joseph, B., Jost ,P., Kaufmann, T., Kepp, O ., Klionsky, D., Knight ,R., Kumar ,S., Lemasters, J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S., Lockshin, R., López,C., Lugli ,E.,Madeo, F., Malorni, W., Marine, J., Martin, S., Martinou, J., Medema, J., Meier , P., Melino, S., Mizushima ,N., Moll, U ., Muñoz,C., Nuñez ,G., 91, Oberst ,A., Panaretakis ,T., Penninger , J.,Peter, M., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J., Puthalakath, H., Rabinovich, G., Ravichandran, K., Rizzuto, R., Rodrigues, C., Rubinsztein, D., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H., Stockwell, B., Szabadkai, G., Tait, S., Tang, H., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden, T., Berghe, Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E., Walczak, H., White, E., Wood,W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G., and Kroemer, G. 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation* 22, 58–73.

Gilbert S. (2005). *Desarrollo embrionario*. 7.^a Edición, Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, p. 902.

Gomez, C. (2010). *Implicación de la entrada de Ca²⁺ regulada por depósitos intracelulares en la señalización mediada por Ca²⁺ en ovocitos de ratón*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, de la Universidad de Extremadura.

Goud, A.P., Goud, P.T., Diamond, M.P., Gonik, B., and Abu-Soud, H.M. (2008). Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 44, 1295–1304.

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(5): 415-8.

Haouzi, D., Hamamah, S. (2009). Pertinence of apoptosis markers for the improvement of *in vitro* fertilization (IVF). *Curr Med Chem.* 15: 1905-1916.

Hoyer, P ., Keating, A . (2014). Xenobiotic effects in the ovary: temporary versus permanent infertility. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*10: 511-523.

Hu, W., Jones, P., DeCoen, W., King, L., Fraker, P., Newsted, J., Giesy, J. (2003). Alterations in cell membrane properties caused by perfluorinated compounds. *Comp BiochemPhysiol C ToxicolPharmacol.* 135: 77–88.

Hu, X.-Z., and Hu, D.-C. (2009). Effects of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate exposure on hepatoma Hep G2 cells. *Archives of Toxicology* 83:851–861.

Huang, Q., Zhang, J., Martin, F.L., Peng, S., Tian, M., Mu, X., and Shen, H. (2013). Perfluorooctanoic acid induces apoptosis through the p53-dependent mitochondrial pathway in human hepatic cells: A proteomic study. *Toxicology Letters* 223:211–220.

Jacquet, N., Maire, M., Rast, C., Bonnard, M., and Vasseur. (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA) acts as a tumor promoter on Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Environmental Science and Pollution Research.* 19:2537-2549.

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

Jiang, Q., Ma, W., Wu, J., Wingard, C.J., and DeWitt, J.C. (2016). Perfluorooctanoic acid-induced toxicity in primary cultures of chicken embryo cardiomyocytes: PFOA Toxicity in Primary Cultures of Chicken Embryo Cardiomyocytes. *Environmental Toxicology* 31: 1580–1590.

Joensen, U., Bossi, R., Leffers, H., Jensen, A., Skakkebaek, N., Jorgensen, N. (2009). Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect.* 117: 923-927.

Johansson, N., Fredriksson, A., Eriksson, P. (2008). Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. *NeuroToxicology.* 29:160–169

Kidder, G., Mhawi, A. (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123: 613-620.

Kleszczynski, K., Stepnowski, P., Skladanowski, A. (2009). Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids II. Disruption of mitochondrial bioenergetics. *ToxicolApplPharmacol.* 235: 182-190.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P., Green, D., Hengartner, M., Knight, R., Kumar, S., Lipton, S., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., and Melino, G. 2009. Classification of cell death. *Cell Death Differ.* 16(1): 3–11.

Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., and Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl Acids: A Review of Monitoring and Toxicological Findings. *Toxicological Sciences* 99(2): 366–394.

Liu, C., Yu, K., Shi, X., Wang, J., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., and Zhou, B. (2007). Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat. Toxicol.* 82:135–143.

Lua, C., Thibodeaux, J., Hanson, R., Narotsky, M., Rogers, J., Lindstrom, A., and Strynar, M. (2006). Effects of Perfluorooctanoic Acid Exposure during Pregnancy in the Mouse. *Toxicological Sciences* 90(2):510–518.

Mashayekhi, V., Tehrani, K.H.M.E., Hashemzaei, M., Tabrizian, K., Shahraki, J., and Hosseini, M.-J. (2015). Mechanistic approach for the toxic effects of perfluorooctanoic acid on isolated rat liver and brain mitochondria. *Human & Experimental Toxicology* 34: 985–996.

Meresman, G. 2011. Relevance of apoptosis in the female reproductive system. *Invest. Clín* 52(3):274-90

Miller, K., Gupta, R., y Flaws, J. (2006). Methoxychlor Metabolites May Cause Ovarian Toxicity Through Estrogen-Regulated Pathways. *Toxicological sciences* 93(1): 180–188.

Nwani, C., Lakra, W., Nagpure, N., Kumar R, Kushwaha B, Srivastava S. (2010). Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Int J Environ Res Public Health* 8: 3298-3312.

Olsen G., Burris J., Ehresman D., Froehlich J., Seacat A., Butenhoff J., Zobel L. (2007). Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexane sulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect.* 115: 1298-1305.

Panaretakis, T., Shabalina, I., Grander, D., Shoshan, M., Depierre, J. 2001. Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 173: 56–64.

Pereiro, N y Lafuente, A. (2012). Toxicología del sulfonato de perfluorooctano (PFOS) como modelo de compuesto orgánico fluorado. *Rev. Toxicol.* 29: 107-116.

Poljsak, B., Šuput, D., and Milisav, I. (2013). Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–11.

Porras, A., and Marzo, I. (2010). Apoptosis: una forma controlada de muerte celular (*Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)*).

Potera, C. (2009). Study Associates PFOS and PFOA with Impaired fertility. *Environ Health Perspect.* 117(4): A148.

Santiquet N, Develle Y, Laroche A, Robert C, Richard F (2012). Regulation of Gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a Gap-FRAP study. *Biology of reproduction* 87(2):46, 1–8.

Schiffirin, E.(2003). Efectos Cardiovasculares de los Receptores Activadores del Proliferador de Peroxisomas (PPAR) en Hipertensión. *Boletín del Consejo Argentino de H.T.A.* – 4:14-17

Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, 1755–1766.

Sheng, C., Vara, N. (1999). Induction of apoptosis in the germline and follicle layer of *Drosophila* egg chambers. *Mechanisms of Development*. 88 :159-172.

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.

So, M., Yamashita, N., Taniyasu, S., Jiang, Q., Giesy, J., Chen, K., Lam, P. (2006). Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ. Sci. Technol.* 40: 2924-2929.

Sobinoff, A., Pye, V., Nixon, B., Roman, S., McLaughlin, E. (2010). Effects of xenobiotic-induced preantral oocyte toxicity on ovarian development and oocyte fusibility. *Toxicol Sci.* 118: 653–666.

Sprick, M., Walczak, H. (2004). The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1644: 125-132.

Steenland, K., Fletcher, T., and Savitz, D. (2010). Epidemiologic Evidence on the Health Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Environmental Health Perspectives*. 118: 8.

Sun, Y.-C., Cheng, S.-F., Sun, R., Zhao, Y., and Shen, W. (2014). Reconstitution of Gametogenesis In Vitro: Meiosis Is the Biggest Obstacle. *Journal of Genetics and Genomics* 41: 87–95.

Takacs, M y Abbott, B. (2006). Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator–Activated Receptors (α, β/d, γ) by Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonate. *Toxicological Sciences* 95(1): 108–117.

Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A.N., Ali, I., Singh, A.K., Shrivastav, T.G., and Chaube, S.K. (2015). Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis* 20, 1019–1025.

Trachootham, D., Lu de W., Ogasawara, M., Rivera, N., and Huang, P. (2008). Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1343–1374.

Tsuda, S. (2016). Differential toxicity between perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA). *The Journal of Toxicological Sciences* 41, SP27-SP36.

Turrens, J. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep.* 17: 3-8.

Upham, B., Park, J., Babica, P., Sovadinova, I., Rummel, A., Trosko, J., Hirose, A., Hasegawa, R., Kanno, J., Sai, K. (2009). Structure-activity-dependent regulation of cell communication by perfluorinated fatty acids using *in vivo* and *in vitro* model systems. *Environ Health Perspect.* 117: 545-551.

Upham, B.L., Deocampo, N.D., Wurl, B., and Trosko, J.E. (1998). Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail. *International Journal of Cancer* 78, 491–495.

Vaquero, E y Morelo, X.(2005).Reactive oxygen species in inflammatory diseases of the pancreas. a possible therapeutic target?.*GastroenterolHepatol.* 28(8): 473-84.

Vested, A., Ramlau-Hansen, C., Olsen, S., Bonde, J., Kristensen, S., Halldorsson, T., Becher, G., Haug, L., Ernst, E., Toft, G. (2013). Associations of in Utero Exposure to Perfluorinated Alkyl Acids with Human Semen Quality and

Reproductive Hormones in Adult Men. *Environmental Health Perspectives*. 121(4): 453-458.

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

Yang, B., Zou, W., Hu, Z., Liu, F., Zhou, L., Yang, S., Kuang, H., Wu, L., Wei, J., Wang, J., et al. (2014). Involvement of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Injury Caused by Perfluorooctanoic Acid Exposure in Mice. *BioMed Research International*. 1–7.

Yang, Q., Xie, Y., and Depierre, J.W. (2000). Effects of peroxisome proliferators on the thymus and spleen of mice. *Clinical & Experimental Immunology* 122:219–226.

Zhang, H., Cui, R., Guo, X., Hu, J., and Dai, J. (2016). Low dose perfluorooctanoate exposure promotes cell proliferation in a human non-tumor liver cell line. *Journal of Hazardous Materials* 313, 18–28.

Zhang, J.-Q., Shen, M., Zhu, C.-C., Yu, F.-X., Liu, Z.-Q., Ally, N., Sun, S.-C., Li, K., and Liu, H.-L. (2014). 3-Nitropropionic Acid Induces Ovarian Oxidative Stress and Impairs Follicle in Mouse. *PLoS ONE* 9(2): e86589