



UNIDAD IZTAPALAPA

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

“EFECTO *IN VITRO* DEL ÁCIDO SULFÓNICO PERFLUOROHEXANO EN LA VIABILIDAD, LAS UNIONES COMUNICANTES Y LA HOMEOSTASIS DE CALCIO DURANTE LA OVOGÉNESIS TEMPRANA DEL RATÓN.”

TESIS

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

PRESENTA

BIÓLOGA: JESSICA TÉLLEZ RAMÍREZ

DIRECTOR

DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

ASESORES

DR. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ
DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

Ciudad de México

20 de Marzo de 2017



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 090
México, 1 de febrero de 2017

Elencó en el centro del Acero sulfúrico perfectamente en la visibilidad, los diversos conductores y la homogeneidad de color durante la observación con ayuda del ratón.

En la ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 20 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los señores miembros del jurado:

DR. JOSÉ MIGUEL RETAMCOBERT RUIZ
DR. RODRIGO CRUZAN HERNÁNDEZ
DR. IVÁN OSIEL RAMÍREZ OCARDO
DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

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

MAESTRA EN ZOOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DR. JESSICA TELLEZ RAMÍREZ

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

Así mismo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso contrario, le fue tomada la protesta.



JESSICA TELLEZ RAMÍREZ
ALUMNA

L.C. JULIO CESAR DE LA CRUZ
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CES

DR. BERTHOLDO CALDERA

PRESENTE

DR. JOSÉ MIGUEL RETAMCOBERT RUIZ

VOCAL

DR. SERGIO CASAS HERNÁNDEZ

VOCAL

DR. IVÁN OSIEL RAMÍREZ OCARDO

SECRETARIO

DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

Este proyecto se realizó en el laboratorio S-248 de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Edmundo Bonilla González

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

Este trabajo fue financiado por los proyectos: CONACYT CB-2012-01-180043 y Fertilización en Mamíferos de la UAM.

La alumna Jessica Téllez Ramírez contó con el apoyo de la beca que otorga el CONACyT con el número de registro: 620335

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Edmundo Bonilla González.

Profesor Titular

Laboratorio de Expresión Génica S248.

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

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: mundo@xanum.uam.mx

ASESORES

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor titular

Laboratorio de Biología Celular S252.

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

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: dino@xanum.uam.mx

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Profesor asociado C

Unidad de Investigación Genética y Toxicología Ambiental

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM

Correo: juserom@unam.mx

JURADO

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular S252.

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

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

Correo: bet@xanum.uam.mx

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Profesor asociado “C”

Laboratorio de Expresión Génica S248.

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

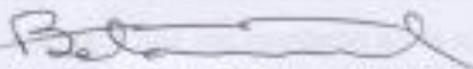
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: ivan.bahena@xanum.uam.mx

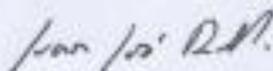
Los abajo firmantes miembros del jurado designado por la División de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Efecto *in vitro* del ácido sulfónico perfluorohexano en la viabilidad, las uniones comunicantes y la homeostasis de calcio durante la ovogénesis temprana del ratón".

El examen se realizó el día 20 del mes de Marzo de 2017.

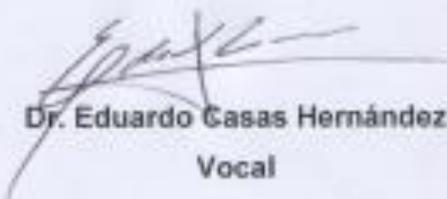
JURADO DE EXAMEN



Dr. José Miguel Betancourt Rule
Presidente



Dr. Juan José Rodríguez Mercado
Secretario



Dr. Eduardo Casas Hernández
Vocal



Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

AGRADECIMIENTOS

En esta sección, quiero dar las gracias a todas y cada una de las personas que fueron importantes e indispensables para poder lograr este objetivo. Todos ustedes me brindaron apoyo y fortaleza, tanto emocional como técnica para realizar este proyecto y por ello es que les estaré eternamente agradecida.

Al Dr. Edmundo Bonilla por darme la gran oportunidad y confianza de trabajar con él y su excelente grupo de trabajo.

Al laboratorio de Biología Celular S252 y al laboratorio de Citometría de Flujo S255 por su apoyo durante la realización del proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial por sus excelentes consejos.

A todos mis compañeros y amigos que me apoyaron en el aprendizaje de técnicas y me brindaron su amistad.

Al Dr. Humberto por su apoyo y asesoría.

A Iván por su paciencia, apoyo y amistad.

A Mario

*A mi familia.
Los amo mucho ♥*

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
Gametogénesis.....	1
Uniones comunicantes	3
Homeostasis de Calcio	8
Toxicología reproductiva.....	11
Compuestos Perfluorados (PFCs)	12
JUSTIFICACIÓN	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
HIPÓTESIS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Diseño experimental	23
Cultivo de ovarios fetales de ratón.....	24
Concentración letal media (CL ₅₀).....	24
Efecto del PFHxS en las uniones comunicantes	25
Efecto del PFHxS en la homeostasis de Ca ²⁺	26
Análisis estadístico	26

RESULTADOS.....	27
PRIMER OBJETIVO: Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀) del PFHxS en ovocitos de ratón fetales <i>in vitro</i>	27
SEGUNDO OBJETIVO: Determinación <i>in vitro</i> del efecto del PFHxS en las uniones comunicantes durante la ovogénesis temprana del ratón.....	32
TERCER OBJETIVO: Determinación del efecto del PFHxS en la homeostasis de Ca ²⁺ en ovocitos de ratón fetales cultivados <i>in vitro</i>	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	42
BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

El PFHxS pertenece a una gran familia de compuestos llamados perfluorados, los cuales han sido producidos desde la década de los 50's en una amplia variedad de productos de la industria. Ha sido detectado en suero de humanos, así como en animales de la vida silvestre y se ha reportado que está relacionado con problemas reproductivos. Se ha demostrado que es capaz de inhibir las uniones comunicantes y de afectar la homeostasis de calcio en células somáticas. Sin embargo, sus efectos en las células germinales permanecen desconocidos, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar si el PFHxS puede afectar la viabilidad, las uniones comunicantes y la homeostasis de calcio de ovocitos de ratón fetal *in vitro*. En este estudio se estimó la concentración letal media en 471.9 μM , además de determinar que los ovocitos sufren alteraciones en las uniones comunicantes y la homeostasis de calcio a 117.97 μM . A pesar de que la concentración más alta reportada en suero humano es menor (3.23 μM), es importante señalar que no podemos descartar un probable impacto negativo del PFHxS en la ovogénesis *in vivo*, ya que en éste estudio la exposición al PFHxS fue aguda (24h), en tanto que las mujeres se encuentran expuestas de manera permanente a este compuesto. Son necesarios estudios adicionales que aclaren los mecanismos moleculares por los que el PFHxS inhibe la comunicación celular y altera la homeostasis de calcio en las células germinales, esto, para poder entender el origen de patologías relacionadas con la infertilidad.

ABSTRACT

PFHxS belongs to a large family of compounds called perfluorinated, which have been produced since the 1950s on a wide variety of industrial products. PFHxS has been detected in human serum as well as in wildlife and has been reported to be related to reproductive problems. Studies on the effects of PFHxS on the organism have shown that it is able to inhibit intercellular communication and to affect calcium homeostasis in somatic cells, but its effects on germ cells remain unknown, so the objective of this study was to determine whether PFHxS can affect the viability, intercellular communication and calcium homeostasis of fetal mouse oocytes *in vitro*. In this study the lethal concentration 50 was 471.95 μM . In addition it was found that the oocytes suffer alterations in cellular communication and calcium homeostasis at 117.97 μM . Although the highest reported serum concentration of exposed workers is 3.23 μM , it should not rule out a probable negative impact of PFHxS on oogenesis *in vivo*, since in this study the exposure to PFHxS was acute (24h), while women are permanently exposed to this perfluorinated compound. Additional studies are needed to further investigate the molecular mechanisms by which PFHxS inhibits cellular communication and alters calcium homeostasis in germ cells, in order to understand the origin of pathologies related to infertility.

INTRODUCCIÓN

La toxicología reproductiva es la rama de la ciencia que estudia el efecto de sustancias dañinas, particularmente en el sistema reproductivo. Los compuestos perfluorados han demostrado ser tóxicos persistentes, sin embargo su efecto en la reproducción no ha sido estudiado. En este trabajo se estudió el efecto del PFHxS, perfluorado muy utilizado en la industria, en la viabilidad, las uniones comunicantes y la homeostasis de calcio de ovocitos de ratón fetal *in vitro*. El trabajo consta de un desarrollo teórico, presentación del problema y objetivos, seguido de los resultados obtenidos y las conclusiones de este trabajo.

Gametogénesis

El proceso de diferenciación de los órganos genitales en sentido masculino o femenino, que se produce durante la vida embrionaria y fetal, involucra una cadena de eventos moleculares, hormonales y no hormonales que se inician en el momento mismo de la formación del huevo o cigoto y se prolongan hasta etapas avanzadas de la vida intrauterina (Rey, 2001).

La morfogénesis del ovario de los mamíferos comienza cuando las células germinales primordiales (CGP) migran desde el epiblasto proximal del embrión en formación y colonizan las crestas genitales o primordios gonadales, dando origen a la gónada primitiva indiferenciada. La colonización provoca que la cresta, morfológicamente aplanada, se transforme en una estructura voluminosa como resultado de una proliferación mitótica activa de las CGP (Vitullo, 2016).

La cresta genital emerge como un engrosamiento del epitelio celómico que se superpone a la cara ventral del mesonefros al 10° día postcoito (dpc) en el embrión de ratón. En ambos sexos, las CGP migran a través de la pared del intestino posterior aproximadamente al 9° dpc y llegan a la cresta genital del 10.5° al 11.5° dpc. En el ovario fetal de ratón, los ovocitos comienzan a formarse alrededor de 13.5 dpc cuando las células germinales femeninas (u ovogonias) dejan de proliferar e inician la

meiosis. Una vez que las CGP colonizan las crestas genitales, se fusionan con las células somáticas y forman las cuerdas ovígeras, que están delimitadas por la deposición de la lámina basal. En el ovario fetal, las cuerdas ovígeras se mantienen como grupos de células germinales femeninas (o nidos de células germinales) que están rodeados libremente por las células somáticas (posteriormente células de la granulosa). Cerca del momento del nacimiento, las células somáticas empiezan a romper los nidos de células germinales encerrando en su interior a los ovocitos, lo que lleva a la formación de folículos primordiales (ovocitos rodeados de una capa de células de la granulosa con forma aplanada) (Figura 1) (Liu et al., 2010).

Una vez que los ovocitos inician la meiosis, progresan a través del leptoteno, zigoteno, paquiteno y, finalmente, se detienen en el diploteno de la primera profase meiótica. Los ovocitos son detenidos en el estadio diploteno del ciclo celular meiótico debido a la transferencia continua de varias moléculas de señalización y factores inhibidores a través de las uniones comunicantes entre las células granulosa circundantes y el ovocito dentro del microambiente folicular. Los ovocitos no reanudan la meiosis hasta la ovulación cuando la hembra alcanza la madurez sexual, gracias al estímulo de las gonadotropinas pituitarias. Una vez que se ocurre la ovulación, los ovocitos completan la primera división meiótica, entran en la segunda división meiótica, y en arresto de nuevo. La segunda división meiótica se completa después de la fertilización (Liu et al., 2010).

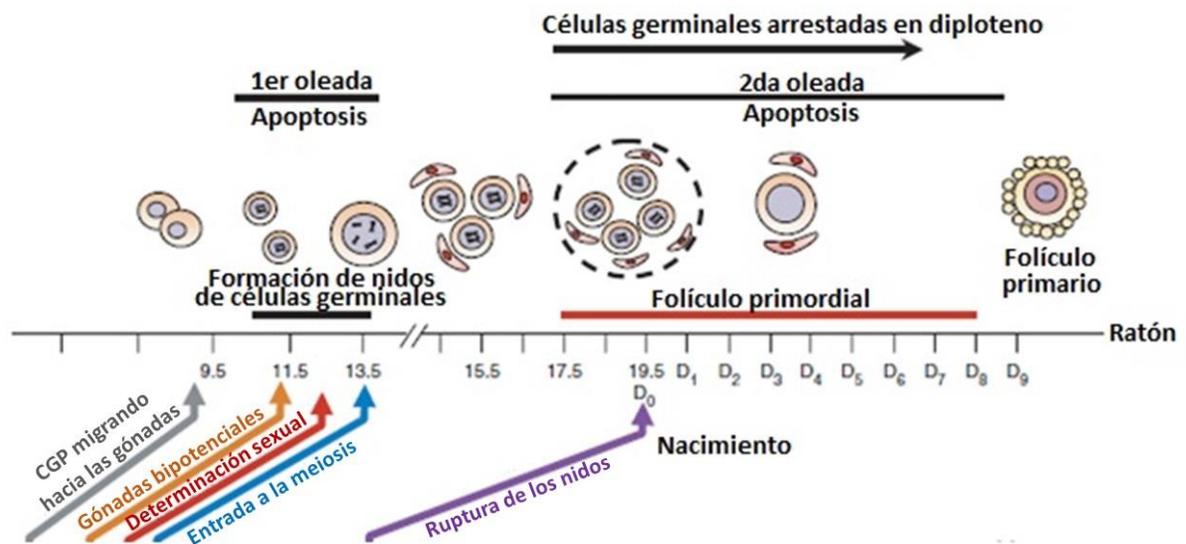


Figura 1. Línea del tiempo de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo fetal del ratón. Durante la ovogénesis ocurren diferentes procesos, iniciando desde la migración de las CGP hacia las gónadas, hasta que comienza la foliculogénesis. La línea del tiempo está representada en días postcoito. D0: es el día de nacimiento (Tomada y modificada de Sarraj y Drummond, (2012)).

Uniones comunicantes

La comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa en el folículo ovárico es necesaria para el mantenimiento de un ovocito sano en detención meiótica, y para la proliferación y diferenciación apropiada de la granulosa. La comunicación ovocito-células de la granulosa se produce tanto por señalización paracrina a través del fluido folicular como a través de uniones que conectan las células de la granulosa entre sí y con el ovocito (Richard y Baltz, 2014).

Esta comunicación se produce a través de uniones comunicantes (también llamadas uniones tipo GAP o de hendidura) que son estructuras especializadas que se forman en puntos de contacto muy estrecho entre célula-célula; en las uniones comunicantes se produce una aposición íntima de las membranas plasmáticas de las dos células adyacentes como consecuencia de la agregación de cientos de canales que atraviesan las dos membranas celulares y que conectan entre sí. Por el poro de estos canales se pueden difundir iones, metabolitos, segundos mensajeros y, en

general, moléculas de hasta 1kD Este tipo de comunicación directa de célula a célula está presente en la gran mayoría de los tejidos y tipos celulares y participa en multitud procesos, entre los que se incluye el control de la proliferación y la diferenciación celular, la transmisión de señales eléctricas, la coordinación de la actividad metabólica y el mantenimiento de la homeostasis celular (Barrio y González-Nieto, 2012).

Cada canal intercelular consta de dos hemicanales (conexones) que se acoplan de extremo a extremo, formando una estructura llamada hemicanal-conexón. Los conexones son estructuras hexaméricas ensambladas, pertenecientes a una gran familia de proteínas de subunidades llamadas conexinas (Cxs). Las Cxs son codificadas por una familia de genes compuesta por al menos 20 genes diferentes en el humano y 21 en ratón, y se denominan con el prefijo Cx seguido de un número que indica la masa molecular teórica aproximada. Los canales de unión formados de diferentes Cxs son permeables a moléculas dependientes de su tamaño y carga molecular (Figura 2) (Kidder y Vanderhyden, 2010).

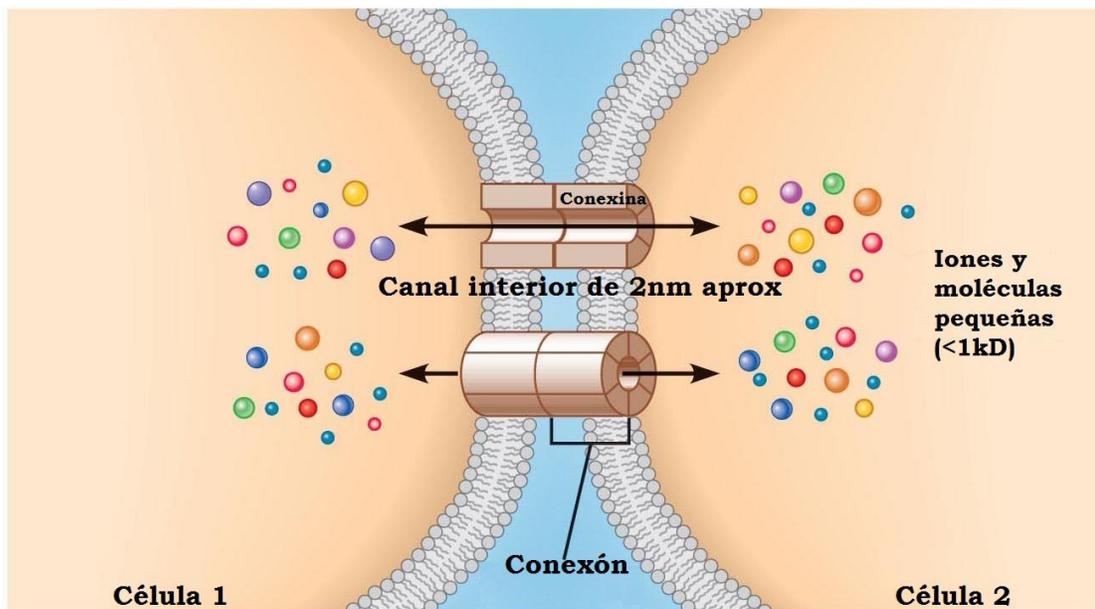


Figura 2. Las uniones comunicantes son canales entre membranas celulares que permiten que iones y pequeñas moléculas pasen directamente de una célula a otra. Estos canales son formados por proteínas de membrana llamadas conexinas (Cxs). En la membrana celular seis conexinas forman un canal o conexón. Cuando los conexones de dos células adyacentes se unen, forman una unión comunicante. Estas uniones comunicantes permiten que iones y moléculas de menos de 1kD pasen directamente de una célula a otra (Tomada y modificada de Stanfield, (2016)).

Los canales intercelulares se forman en dos etapas; en una primera fase, las Cxs se sintetizan y se oligomerizan formando hexámeros o conexones, que son transportados en vesículas hasta la superficie celular. En una segunda fase, las células deben aproximarse lo suficiente como para que los hemicanales de una célula lleguen a contactar con los de la célula vecina, y si son compatibles se unen; finalmente el canal intercelular recién formado adquiere la conformación de canal abierto y los citoplasmas de dos células entran en contacto directo (Barrio y González-Nieto, 2012).

No todos los canales intercelulares son iguales, esta función depende de qué Cxs estén formando los canales. Cada canal puede diferir sustancialmente en cuanto a sus propiedades biofísicas, i.e., conductancia unitaria y permeabilidad, y a sus mecanismos de regulación. La comunicación intercelular es un fenómeno plástico, ya que los canales de Cxs no forman estructuras rígidas sino que son capaces de abrirse o cerrarse en función de multitud de estímulos fisiológicos y patológicos, como son: los cambios en el pH intracelular, el gradiente de voltaje entre el interior de las células acopladas, las variaciones en el potencial de membrana, y el grado de fosforilación o defosforilación de las Cxs del canal. Estos mecanismos de regulación, denominados de “compuerta”, modulan el grado de comunicación intercelular, pudiendo originar transiciones entre acoplamiento a desacoplamiento y viceversa en una escala de tiempo rápida, de menos de un milisegundo a varios minutos. La modulación de la comunicación intercelular a más largo plazo está regulada a nivel de su expresión génica (Patel et al., 2014).

La capacidad de algunas Cxs para combinarse con otras Cxs confiere una mayor diversidad funcional a la comunicación intercelular, y posibilita que se conecten entre sí, no solo células del mismo tipo, sino también entre células de tipos diferentes que expresan Cxs compatibles. Cuando la composición en Cxs de los dos hemicanales es la misma (i.e., los canales son de tipo homotípico), la comunicación intercelular es simétrica y son los gradientes electroquímicos los que determinan la magnitud y la direccionalidad de la difusión de los iones y de las otras moléculas permeables. Sin embargo, cuando la composición en Cxs de los hemicanales es distinta (i.e., los

canales que se forman son de tipo heterotípico), la comunicación intercelular tiende a volverse asimétrica, ya que las diferencias de conductancia y permeabilidad entre los hemicanales pueden crear una barrera para la difusión y el movimiento de iones y de otras moléculas ocurre preferentemente en una sola dirección (Figura 3) (Winterhager y Kidder, 2015).

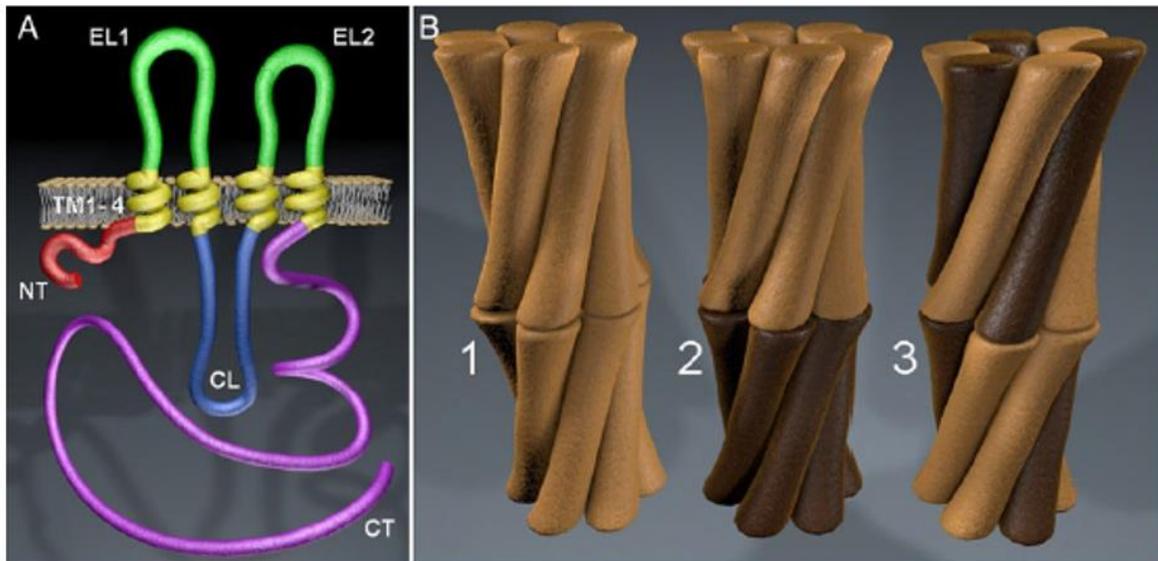


Figura 3. Representación esquemática de las Cxs y los canales de uniones comunicantes. Las Cxs se oligomerizan para formar conexones hexaméricos en la membrana plasmática, los cuales se unen con conexones de células adyacentes para formar uniones comunicantes. (A) Todas las Cxs comparten la misma topología transmembranal, consistente en 4 dominios transmembranales (TM1-4), un asa citoplasmática (CL), dos asas extracelulares (EL1, EL2) y el dominio del amino-terminal (NT) y del carboxilo-terminal (CT) orientados hacia el interior celular. (B) Las propiedades de permeabilidad de los canales de las uniones comunicantes dependen de la composición de las Cxs que las formen: los canales pueden ser: 1) homotípico o 2 y 3) heterotípico (Tomado de Winterhager y Kidder, (2015)).

En el ovario de varias especies, la Cx37 y la Cx43 son las que se expresan de manera más abundante. En el ratón, durante la foliculogénesis, las uniones comunicantes compuestas por la Cx37 modulan la comunicación ovocito-células de la granulosa, mientras que las uniones comunicantes compuestas por la Cx43 establecen la comunicación entre las células de la granulosa conectándose entre ellas (Fig. 4) (Kibschull et al., 2015).

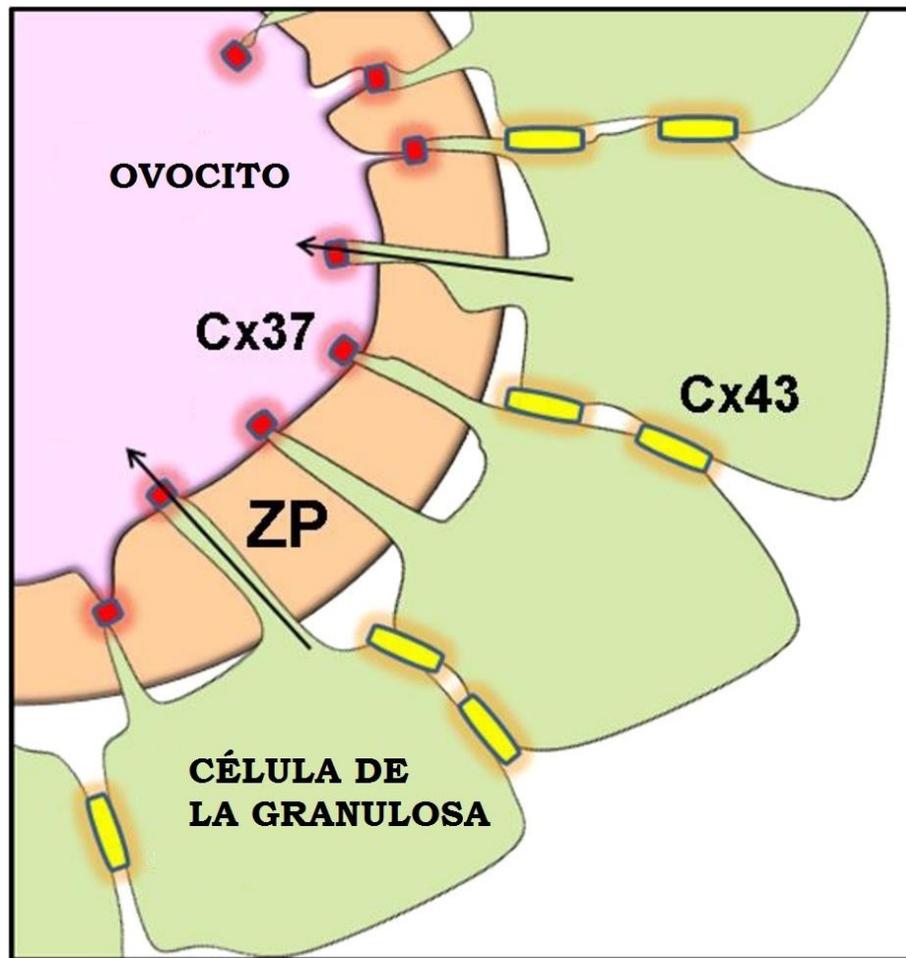


Figura 4. Rol de las uniones comunicantes en el folículo ovárico. La Cx37 y la Cx43 son expresadas predominantemente en los folículos de mamíferos. La Cx43 (en amarillo) forma uniones comunicantes entre las células de la granulosa. Las células de la granulosa están metabólicamente acopladas con los ovocitos a través de proyecciones transzonales desde las células de la granulosa que atraviesan la zona pelúcida (ZP) y forman uniones comunicantes con la membrana plasmática del ovocito (en rojo). Modelos animales revelan que la Cx37 forman uniones comunicantes en la interfase ovocito-célula de la granulosa, las cuales son responsables del intercambio de metabolitos y moléculas de señalización, tales como el GMPc, importante para la foliculogénesis (Tomada y modificada de Kibschull et al., (2015)).

Estas uniones comunicantes sirven como una red coordinada de comunicación entre los componentes citosólicos, regulando diferentes aspectos del desarrollo folicular. Las uniones comunicantes forman la estructura básica de cooperación metabólica entre las células somáticas y germinales, permitiendo el paso directo de factores críticos nutricionales y regulatorios entre ambos tipos celulares. Numerosos compuestos que el ovocito es capaz de tomar en cantidades significativas, se

producen o asimilan en las células de la granulosa a través de las uniones comunicantes. Entre éstos están la colina, la uridina, la glucosa, varios aminoácidos y la hipoxantina (Cuadro 1). Los ovocitos inmaduros dependen de las células foliculares adherentes para poder crecer in vitro, lo que indica que las uniones comunicantes son cruciales para su desarrollo. Además, las células foliculares también son fuentes de otros factores como el AMPc, necesario para el ovocito durante el desarrollo de la meiosis (Downs, 1995).

Cuadro 1.- Evidencia de moléculas orgánicas e inorgánicas específicas que cruzan desde las células de la granulosa hacia los ovocitos a través de las uniones comunicantes.

Ion o molécula	Referencia
Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺	(Arellano et al., 2002)
AMPc	(Bornslaeger y Schultz, 1985) (Salustri et al., 1985)
GMPc	(Norris et al., 2009)
Ribonucleósidos	(Heller y Schultz, 1980) (Moor et al., 1980) (Heller et al., 1981) (Colonna y Mangia, 1983)
Aminoácidos	(Colonna y Mangia, 1983, Eppig et al., 2005, Haghghat y Van Winkle, 1990)
2-Deoxiglucosa	(Brower y Schultz, 1982)
Colina	(Heller et al., 1981, Moor et al., 1980)
Inositol	(Moor et al., 1980)

(Tomado y modificado de Kidder y Vanderhyden, (2010)).

Homeostasis de Calcio

El calcio (Ca²⁺) es un transductor de señales importante, que actúa en asociación con proteínas. Dado que la afinidad del Ca²⁺ hacia las diferentes proteínas varía mucho (de nM a mM), esta interacción resulta, ya sea en la amortiguación o en el desencadenamiento de funciones específicas que alteran el metabolismo celular.

El Ca²⁺ celular está muy concentrado en el retículo endoplásmico (RE), que no es simplemente un lugar de almacenamiento, sino un reservorio dinámico que responde a la estimulación celular eléctrica y química liberando o absorbiendo Ca²⁺,

favoreciendo así la señalización fisiológica rápida dependiente de Ca^{2+} (Chernorudskiy y Zito, 2017).

Se ha demostrado que la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes, participa en las transiciones meiótica y mitótica en muchos tipos celulares. En ovocitos de mamíferos, las oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) están asociadas con la fertilización y la activación del desarrollo. Sin embargo, el papel de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el desarrollo de ovocitos de mamíferos no ha sido completamente entendido. En ovocitos de ratón y de hámster, los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ están presentes antes del rompimiento de la vesícula germinal (RVG), aunque no parecen necesarios para su finalización. En los ovocitos bovinos y porcinos, el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ parece necesario para el RGV y la progresión de la meiosis, ya que la adición de quelantes de Ca^{2+} retarda o bloquea la progresión de la meiosis. Se desconoce si durante el desarrollo de los ovocitos de estas especies existen oscilaciones espontáneas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (He et al., 1997)

Los ovocitos de mamífero completamente crecidos son detenidos en la etapa de vesícula germinal (VG) y están dotados de almacenes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reservas bajas. A medida que la maduración se produce después de la señalización de la hormona luteinizante (LH), el Ca^{2+} aumenta de forma constante hasta la MII, potenciando la liberación de Ca^{2+} mediada por Inositol trifosfato (IP_3) y promoviendo la adquisición de oscilaciones similares a la fecundación (Cheon et al., 2013).

Se ha demostrado que las oscilaciones espontáneas de calcio se observan por primera vez en los ovocitos de ratón en crecimiento, alrededor del tiempo de la maduración cuando la capacidad de reanudar la meiosis es aparente y no en los ovocitos que son meióticamente incompetentes o inmaduros. También, después de que la meiosis se reanuda, ya sea *in vitro* o *in vivo*, la aparición de oscilaciones espontáneas de calcio disminuye drásticamente entre 2 y 5 horas después de la liberación del folículo (Carroll et al., 1994). Se ha demostrado que varios de los parámetros de la homeostasis de Ca^{2+} cambian progresivamente durante la maduración, por ejemplo el Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplásmico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) aumenta constantemente durante la maduración y las moléculas responsables de

estos ajustes en la homeostasis de Ca^{2+} pueden experimentar modificaciones dinámicas durante la maduración tal como algunos de los mecanismos o canales activos en la etapa VG pueden no serlo en la etapa MII y viceversa (Wakai y Fissore, 2013).

Algunos datos han mostrado que la inyección de Ca^{2+} en ovocitos de ratón induce activación partenogenética y el subsiguiente desarrollo embrionario normal. La literatura revela que el reinicio de la meiosis es mediada tanto por corrientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como de la membrana plasmática, a veces en una cooperación sinérgica. En algunas especies, las corrientes intracelulares estimuladas por ionóforos de Ca^{2+} inducen la maduración de ovocitos (Tosti, 2006).

En los mamíferos, como un esquema general, la maduración del ovocito implica la reanudación de la meiosis en respuesta a una oleada de LH, la disrupción de las uniones comunicantes después de la estimulación de gonadotropinas y una disminución en los niveles de AMPc (Fig.5). Aunque se conoce un papel potencial de las corrientes de Ca^{2+} en la reanudación de la meiosis, aún no se ha dilucidado si: i) el Ca^{2+} participa por sí mismo como señal positiva en el RVG inducida por LH o, ii) los otros factores que atraviesan las uniones comunicantes pueden influir en los niveles de Ca^{2+} dentro de los ovocitos. La literatura muestra que se requiere la oscilación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para la maduración espontánea en ovocitos de ratón y de cerdo, y que el aumento en las concentraciones de Ca^{2+} en el momento del RVG confirma la relación entre las corrientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la maduración de ovocitos en varias especies. La aparición de oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en el ovocito de ratón en estadio de VG durante la maduración meiótica *in vitro* mostró la implicación de un mecanismo dependiente de IP_3 en hámster, bovino y humanos (Wakai y Fissore, 2013).

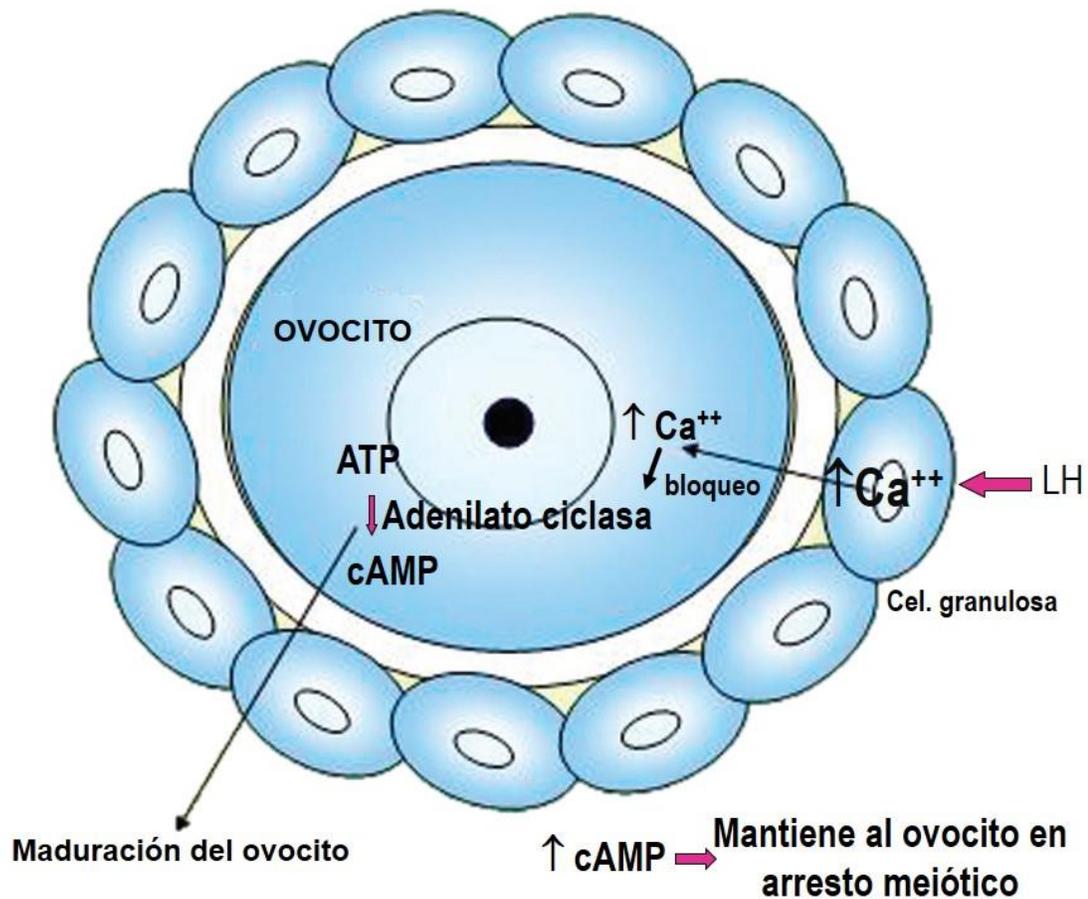


Figura 5. Esquema general de la participación del calcio en la maduración del ovocito. La unión de la LH a su receptor en la célula de la granulosa estimula la entrada de calcio a través de las uniones comunicantes al ovocito. Un aumento en las concentraciones de calcio dentro del ovocito bloquea a la adenilato ciclasa lo que a su vez disminuye el AMPc y permite la reanudación meiótica en el ovocito. Altas concentraciones de AMPc mantienen al ovocito en arresto meiótico (Tomada y modificada de Ben-Ami et al., (2006)).

Toxicología reproductiva

La toxicología reproductiva se define como la rama de la toxicología que estudia los efectos deletéreos producidos por agentes exógenos (xenobióticos) en la reproducción. Estos actúan sobre la progenie y/o alteran las funciones reproductivas tanto masculinas como femeninas (Robert, 2001, Serrano et al., 2001). La exposición perinatal a contaminantes ambientales y a otros agentes químicos afecta en forma irreversible la diferenciación y programación de varios tipos celulares, alterando

cualitativa y cuantitativamente su función y determinando el desarrollo de patologías más tarde en la vida (Tchernitchin y Mena, 2006).

Dentro de los xenobióticos se incluyen agentes químicos naturales o sintéticos. Las alteraciones sobre la salud más frecuentemente asociadas con la exposición con sustancias químicas sintéticas, tanto en animales (peces, reptiles, pájaros, mamíferos) como en el humano, incluyen disfunciones tiroideas, alteraciones en el crecimiento, aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino, disminución de la fertilidad, pérdida en la eficacia del apareamiento, anomalías del comportamiento, alteraciones metabólicas desde el nacimiento, desmasculinización o feminización, así como alteraciones del sistema inmune e, incluso, incremento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer (Salame-Méndez et al., 2010), por mencionar algunas.

En el mundo, se estima que existen alrededor de 13 millones de compuestos químicos, incluyendo los naturales y los sintéticos. La Agencia para la Protección al Ambiente de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) aceptan que, aproximadamente, 112 000 de estos compuestos son sintetizados por el hombre para uso cotidiano y que una media de 2000 sustancias químicas nuevas se incorporan anualmente al censo por la actividad humana; de tal manera que el hombre y toda clase de vida de su entorno se encuentran expuestos a ellos (Fernández-Barocio y Sánchez-Villegas, 2013).

Compuestos Perfluorados (PFCs)

Los PFCs son compuestos muy estables, que han sido fabricados por el hombre desde 1950 y utilizados ampliamente en aplicaciones comerciales e industriales como agentes tensoactivos, en productos como papel, revestimientos textiles, alimentos y embalajes (Calafat et al., 2007). Se componen de una cadena principal de carbono fluorado de longitud variable y un grupo funcional carboxilato o sulfonato. Esta estructura anfipática proporciona propiedades de repelencia al agua y al aceite y resistencia a las manchas (Conder et al., 2008). Los carboxilatos perfluorados o

perfluoroalquil-carboxilatos incluyen el ácido perfluorooctanoico (PFOA, con fórmula $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_6\text{-COOH}$), el ácido perfluorononanoico (PFNA) y el ácido perfluorodecanoico (PFDA, con fórmula $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_8\text{-COOH}$). Los sulfonatos perfluorados o perfluoroalquil sulfonatos incluyen el ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS, con fórmula $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-SO}_3\text{H}$), y el ácido sulfónico perfluorohexano (PFHxS, con fórmula $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_5\text{-SO}_3\text{H}$) (Nelson et al., 2010).

La producción mundial total de perfluoroalquil-sulfonatos de 1970 a 2002 fue de aproximadamente 100 000 Ton (Paul et al., 2009). Su producción ha disminuido debido a la suspensión de fabricación por la compañía 3M, pero aún es elevada. Se estima que, en China durante 2006, la producción fue de más de 200 Ton; en tanto que la de perfluoroalquil-carboxilatos para ese mismo año fue de 9 mil toneladas (United States Environmental Protection Agency, 2016).

En los últimos años, se han encontrado PFCs en el aire de varias regiones de la tierra, y su detección en la atmósfera del Ártico atrajo el interés científico. Las concentraciones detectadas de PFC en el hemisferio norte, en el Ártico canadiense y el Océano Atlántico fueron de 2, 11 y 40 pg/m^3 respectivamente, mientras que, en zonas pobladas del hemisferio norte fueron de 972 pg m^{-3} ; en Europa Central, 243 pg/m^3 ; en Asia, 2466 pg/m^3 y América del Norte, 403 pg/m^3 (Annamalai y Namasivayam, 2015).

Aunque las fuentes principales de exposición humana son poco conocidas, se sabe que se pueden ingerir a través de la dieta, el agua potable y el polvo. Una vez que entran en el cuerpo humano, los PFCs se eliminan lentamente y no se someten a reacciones de biotransformación (Lau et al., 2007). Se bioacumulan debido a que se unen a las proteínas en hígado y suero. Su vida media en suero en humanos se estiman en 5.4 años para el PFOS y 3.8 años para el PFOA. Se asume que los compuestos de cadena más corta podrían tener tiempos de vida media menores, aunque el PFHxS es una excepción, con una vida media estimada de 8.5 años (Nelson et al., 2010).

Se han encontrado residuos de PFCs en hígado, tejido adiposo, suero de animales de vida silvestre y humano. Es importante destacar que en la leche materna y en la

sangre del cordón umbilical han sido detectados. Este fenómeno es común en poblaciones desde las regiones polares hasta zonas industrializadas (Wolf et al., 2008).

A nivel celular, los PFCs pueden producir proliferación de peroxisomas, mientras que a nivel fisiológico se han relacionado con el desarrollo de hepatomegalia, hiperplasia y hepatocarcinogénesis (Sohlenius et al., 1994, Wolf et al., 2012). Keil et al., (2008), demostraron que, durante el desarrollo, el sistema inmune de ratones expuestos a PFCs es afectado, lo que resulta en alteraciones funcionales en la inmunidad innata y humoral. Johansson et al., (2009) detectaron alteraciones en la expresión de proteínas importantes para el crecimiento neural y la sinaptogénesis en ratones neonatos expuestos a PFCs (Keil et al., 2008).

Se ha postulado que el aumento a la exposición de contaminantes ambientales e industriales es responsable de la disminución global de la fertilidad. Estudios en mujeres han sugerido asociaciones entre la exposición a los PFCs y alteración de las funciones reproductivas (Bach et al., 2016, Kristensen et al., 2013), sin embargo, el efecto directo de los PFCs en la fertilidad femenina y los mecanismos biológicos que interfieren han sido poco estudiados. En mujeres con niveles altos de PFOA y PFOS en suero, aumentó el riesgo de infertilidad y el ciclo menstrual se tornó irregular (Annamalai y Namasivayam, 2015). Otros estudios demostraron que la exposición a PFCs puede ser causa de síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, menopausia precoz y retraso en la ovulación (Buck et al., 2011, Governini et al., 2011, Konkell, 2014, Lyngso et al., 2014, Taylor et al., 2014, Vagi et al., 2014)

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). En una muestra de pacientes sometidas a protocolos de técnicas de reproducción asistida se observó una correlación entre los niveles de PFCs en el FF y la tasa de fertilización. Las pacientes que contenían concentraciones altas de PFCs en el FF, tenían menor tasa de fertilización y menos embriones transferidos, en comparación con el grupo de mujeres del grupo control (Governini et al., 2011).

En células somáticas está bien documentado que varios PFCs interfieren con las uniones comunicantes, también llamadas de hendidura o gap (Upham et al., 2009). En el caso de los ovocitos durante la foliculogénesis y la maduración, estas uniones intercelulares resultan fundamentales para establecer una cooperatividad metabólica entre éstos y las células de la granulosa, por lo que es muy probable que ocurran alteraciones en estas estructuras durante la maduración de los ovocitos que finalmente puedan ser causa de infertilidad.

Dominguez et al., (2016), demostraron que el PFOS perturba las uniones comunicantes de ovocitos porcinos, además de afectar negativamente la viabilidad y la maduración de ovocitos de porcino expuestos *in vitro* a PFOS.

Los PFCs también afectan la homeostasis de calcio y la función mitocondrial en células somáticas, que pueden ser factores esenciales para el desencadenamiento de apoptosis (Kleszczynski y Skladanowski, 2011, Kleszczynski et al., 2009). Sin embargo en ovocitos no hay reportes de su influencia. La homeostasis de calcio es fundamental para todos los tipos celulares, por lo que se espera que la maduración de ovocitos y, por ende la fertilización, se vean afectados tras su exposición a PFCs.

En un trabajo reciente se demostró que el PFOS puede afectar la reproducción, ya que se observó un efecto negativo en la viabilidad y maduración de ovocitos porcinos, así como también disminución de la viabilidad de las células del *cúmulus* tratadas en un modelo *in vitro* (Teteltitla, 2014)

Los efectos adversos provocados por PFOS y PFOA han sido motivo de investigación en las últimas décadas (Dominguez et al., 2016, Inoue et al., 2004, Jacquet et al., 2012, Johansson et al., 2009), sin embargo, otros PFCs han sido poco estudiados. Inicialmente se pensaba que los PFCs de cadena corta tenían efectos similares a PFOS, aunque menos riesgo de bioacumulación y toxicidad (Barmentlo et al., 2015). Gorrochategui et al., (2014), compararon la toxicidad de varios PFCs, encontrando una correlación positiva entre la longitud de la cadena de carbono de PFCs y su toxicidad en una línea celular de hepatocarcinoma humano. A pesar de esto, se demostró que tanto PFOS como los PFCs de cadena corta promovieron la expresión de estrógenos y el receptor de andrógenos y causaron efectos hepato-

histológicos negativos en el anfibio *Xenopus laevis* en concentraciones altas (100-1000 mg/L), lo que abre la cuestión de si los PFCs de cadena corta podrían sustituir a los PFCs de cadena larga en la industria sin producir los efectos adversos de PFOS.

El PFHxS es uno de los PFCs más ampliamente distribuidos y se ha sugerido que pueden producir un efecto neurotóxico. Se ha detectado en alimentos de consumo humano, así como en el polvo doméstico, principalmente de alfombras y tapicería (Beesoon et al., 2012). Un número creciente de estudios de biomonitorio han demostrado su presencia en la sangre de la población animal y humana (Cuadro 2), así como en la sangre del cordón umbilical y en la leche materna humanos, lo que indica que el PFHxS es un contaminante ambiental ubicuo y su exposición se produce a partir de la etapa fetal y durante toda la vida. Esto ha levantado una gran preocupación por sus efectos sobre la salud y la reproducción (Lee et al., 2014).

Cuadro 2. Concentraciones de PFHxS reportados para la población en general, laboralmente expuestos y para fauna de vida silvestre.

Población en general	USA	Suecia	Japón	Brasil	Corea	España	Canadá (laboralmente expuestos)
concentraciones en suero (µM)	0.1	0.6	0.2	0.3	0.5	0.5	3.23
Animales de vida silvestre	Pato		Peces		Tortugas		Oso polar
Concentraciones en suero (µM)	0.4		3		0.2		0.8

(Tomado y modificado de Beesoon et al., (2010)).

Lee et al., (2014), examinaron los efectos de PFHxS sobre la muerte celular neuronal y los mecanismos subyacentes, reportando que este compuesto produce apoptosis en las células granulares del cerebro.

Por otro lado, la Compañía 3M no encontró toxicidad reproductiva o del desarrollo asociado con la exposición a PFHxS en ratas, pero otros autores han

demostrado en animales de experimentación que estos compuestos se eliminan entre 1 y 4 meses (Sundstrom et al., 2012) e inducen alteraciones en el metabolismo de triglicéridos y colesterol (Bijland et al., 2011).

En estudios recientes se detectaron cambios en la expresión de genes que regulan el desarrollo del tejido, la organización celular y la señalización de célula a célula en embriones de pollo expuestos *in ovo* a PFHxS (Beesoon et al., 2012, Cassone et al., 2012), mientras que Vongphachan et al., (2011), encontraron que el PFHxS altera la expresión de la hormona tiroidea a nivel transcripcional en el pollo durante el desarrollo embrionario y Gorrochategui et al., (2014) reportó que este perfluorado inhibe la actividad de la aromatasa CYP19 en placenta humana.

En los estudios realizados por Velez et al., (2015), se demostró que PFOA y PFHxS están relacionados con un retraso en el tiempo para conseguir un embarazo incluso a niveles de exposición bajos.

Por lo arriba mencionado, el interés de este estudio es caracterizar los efectos del PFHxS durante la ovogénesis temprana en el modelo de ratón fetal *in vitro*.

JUSTIFICACIÓN

Los PFCs han sido utilizados de manera indiscriminada, por lo que son contaminantes ubicuos del ambiente, frecuentemente encontrados en el agua, en los alimentos y presentes en el entorno doméstico.

Se bioacumulan y, en humanos, se han encontrado concentraciones plasmáticas de PFHxS de 1.96 ng/ml en el periodo 2007/2008 en pobladores de USA (United States Environmental Protection Agency, 2016).

El PFHxS es uno de los compuestos perfluorados más ampliamente distribuidos en el ambiente y se le ha relacionado con alteraciones en la señalización célula-célula y la homeostasis de Ca^{2+} en células somáticas. En el gameto femenino, el Ca^{2+} y las uniones comunicantes son fundamentales para que el ovocito pueda madurar y llegar a ser viable para la fertilización. Alteraciones en la comunicación del ovocito-células de la granulosa son causa de infertilidad.

En células somáticas se han realizado varios estudios acerca de los efectos de la exposición a los PFCs, por ejemplo, cómo afectan a las uniones comunicantes, sin embargo, en ovocitos la información es escasa aunque se sabe que afectan las uniones comunicantes en porcinos expuestos a PFOS. En cuanto a la homeostasis de calcio no existen reportes de cómo los PFCs alteran las concentraciones de Ca^{2+} en el ovario o en el mismo ovocito.

No se conoce el efecto del PFHxS sobre el desarrollo temprano de ovocitos en mamíferos, por lo que consideramos relevante evaluar el efecto del PFHxS sobre las uniones comunicantes y la homeostasis de Ca^{2+} durante la ovogénesis temprana del ratón *in vitro*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a los antecedentes mencionados, es importante evaluar si la viabilidad, las uniones comunicantes y la homeostasis de Ca^{2+} son alteradas por el PFHxS durante la ovogénesis temprana de ratón *in vitro*.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El PFHxS afectará la viabilidad, las uniones comunicantes y la homeostasis de Ca^{2+} durante la ovogénesis temprana de ratón *in vitro*?

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto *in vitro* del PFHxS en la viabilidad, las uniones comunicantes y la homeostasis de Ca^{2+} durante la ovogénesis temprana del ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la concentración letal media (CL_{50}) del PFHxS en ovocitos de ratón fetales *in vitro*.
- Determinar si el PFHxS interfiere en las uniones comunicantes durante la ovogénesis temprana *in vitro*.
- Determinar si el PFHxS altera la homeostasis de Ca^{2+} de ovocitos de ratón fetales *in vitro*.

HIPÓTESIS

Si los PFCs han mostrado alterar la función de las uniones comunicantes, así como la homeostasis de Ca^{2+} en células somáticas, entonces el PFHxS causará alteraciones de las uniones comunicantes y sobre la homeostasis de calcio en cultivos de ovocitos durante la ovogénesis temprana del ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

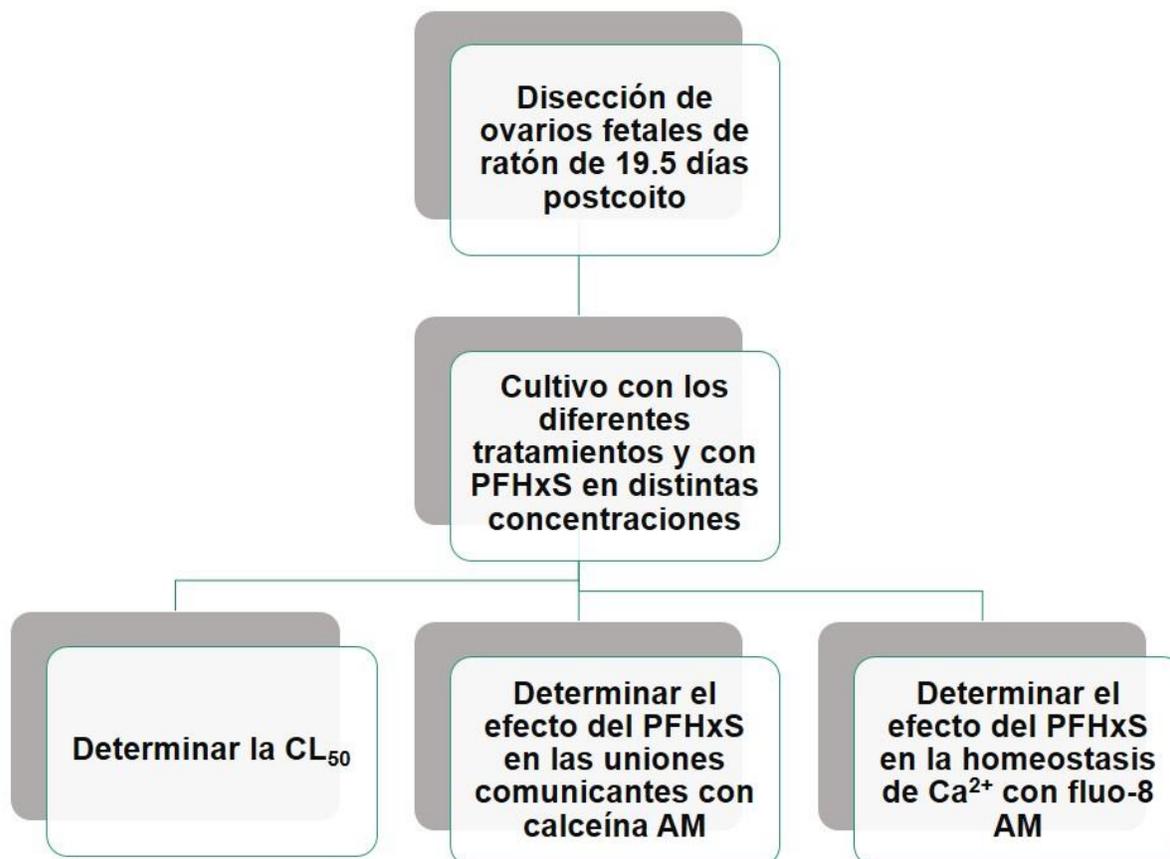


Figura 6. Diagrama del diseño experimental.

Para poder establecer la CL_{50} se emplearon concentraciones desde 10 hasta 600 μM de PFHxS diluido en DMSO. Para ver el efecto del PFHxS en las uniones comunicantes y la homeostasis de Ca^{2+} se utilizaron concentraciones sub-letales de la CL_{50} (1/4 y 1/8). Este trabajo se realizó bajo los Lineamientos para la Conducción Ética de la Investigación 2010 aprobado por la Comisión de Bioética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

Para el cumplimiento de los objetivos se utilizó el modelo del ratón para el estudio de la ovogénesis temprana y el efecto del PFHxS. A continuación, se describe la metodología

Cultivo de ovarios fetales de ratón.

Para los ensayos de viabilidad y homeostasis de Ca^{2+} , los ovarios de embriones de ratón de 19.5 dpc se disectaron y cada ovario se cortó en 3 fragmentos utilizando agujas finas (G 5/8) bajo el microscopio estereoscópico. Los fragmentos de ovario se cultivaron en cajas de 24 pozos, en medio Waymouth (Waymouth MB 752/1 Medium con L-glutamina y 2 gramos de bicarbonato de sodio, Sigma) suplementado con suero de caballo (5%), suero fetal bovino (2.5%) y penicilina (100 μ g/ml)/estreptomicina (1/ml) (1%), a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, durante 7 días. El medio fue sustituido por medio nuevo cada tercer día. Hacia el día 7 de cultivo, un gran número de ovocitos, con un tamaño de 50-70 μ m en estadio de vesícula germinal fueron muy visibles en los explantes de ovario.

Para el ensayo de las uniones comunicantes, ovarios de 19.5 dpc fueron disectados y cultivados completos en cajas de 24 pozos. Cada pozo se acondicionó con una placa de cultivo celular (Millicell® Culture Plate Inserts, Alemania) en donde se puso el ovario durante 7 días en medio DMEM/F12 (DMEM/F12 (1:1) (1X) Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (Ham), con L-glutamina y 2.438 g/L de bicarbonato de sodio, Gibco) + α MEM (MEM Alpha (1X) Minimum Essential Medium, con L-glutamina, ribonucleósidos y deoxiribonucleosidos, Gibco) suplementado con 0.23 mM ácido pirúvico; 3% (w/v) albumina sérica bovina (BSA) (Bovine Albumin Fracción V, pH. 7. 0, ICN, MP Biomedicals, Inc, USA); mix de insulina (5mg/mL), transferrina (mg/mL), selenito de sodio (5ng/mL) (mix ITS, Gibco); 100 UI/mL penicilina G, 100 μ g/mL de sulfato de estreptomicina.

Concentración letal media (CL₅₀).

Al séptimo día de cultivo, los explantes de ovario se incubaron con concentraciones crecientes de PFHxS diluido en DMSO (200, 350, 400, 425, 450, 475

y 500 μM) en todos los casos se contó con un control al que no se le aplicó ningún tratamiento y otro grupo control con DMSO. Después de 24h, se lavaron e incubaron en medio fresco.

Para determinar la viabilidad, al séptimo día de cultivo se llevó a cabo el conteo de ovocitos por pozo, (el cual será llamado tiempo 0 (T0)). Posteriormente expusieron al PFHxS durante 24h. Transcurrido el tiempo de exposición, se realizó un nuevo conteo en cada pozo para determinar la CL_{50} (tiempo 24: T24). Posteriormente se incubaron en 200 μL de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (45 μM) durante 30 minutos a una concentración de 0.5 mg/mL. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La viabilidad se analizó bajo el microscopio de campo claro (OLYMPUS CX31) a 400X, considerando los ovocitos incoloros como muertos y los de color purpura como vivos.

Efecto del PFHxS en las uniones comunicantes

Se empleó un bioensayo para analizar el efecto del PFHxS en las uniones comunicantes durante la ovogénesis temprana. Esto se llevó a cabo mediante el uso de los marcadores fluorescentes Calceína AM 1 μM (39,69-Di (Oacetil)-29,79-bis [N, N bis (carboximetil) amino metil]-fluoresceína, tetraacetoxi metil éster; Molecular Probes, Life Technologies, USA). La calceína AM es un colorante que penetra en la célula por su grupo funcional AM, una vez en la célula, algunas esterasas hidrolizan el grupo AM, esta nueva estructura únicamente puede ser transportada a otras células a través de uniones comunicantes, por lo que puede utilizarse para determinar la viabilidad celular en la mayoría de las células eucariotas. En células vivas, la calceína AM no fluorescente se convierte en calceína con fluorescencia verde tras la hidrólisis del acetoximetil éster por parte de las esterasas intracelulares. Los ovarios se incubaron como se describió previamente. Al 7^o día de cultivo, los ovarios se expusieron a concentraciones subletales de la CL_{50} de PFHxS (1/4 y 1/8). Como control positivo se utilizó el inhibidor de uniones comunicantes carbenoxolona disódica (100 μM)

(Carbenoxolone disodium salt, Sigma, USA) (Juszczak y Swiergiel, 2009). Después de 24 horas de exposición se realizó un corte transversal en los ovarios y se incubaron en una mezcla de 2µl/mL de calceína (1µM) y 50µl/mL (45µM) de Hoechst en PBS. Después de 15 minutos se retiró el exceso de colorante y se lavaron 3 veces en PBS. Posteriormente se incluyeron en medio de congelación (Tissue-Tek, O.C.T. Compound. 10.24% w/w alcohol polivinil; 4.26% w/w glico polietileno y 85.50% w/w ingredientes no reactivos). Se realizaron cortes de 10 µm perpendiculares al corte inicial. La emisión de fluorescencia de las muestras se analizó en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axio Star Plus) (λ_{ex} 496 nm; λ_{em} 516 nm). Entre más uniones comunicantes funcionales tenía el tejido, la migración de calceína desde el sitio de corte inicial del tejido fue mayor y se observó en color verde. El análisis de fluorescencia de las imágenes se realizó con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012).

Efecto del PFHxS en la homeostasis de Ca^{2+}

Se llevó a cabo con el empleo de un fluorocromo con afinidad alta al $[Ca^{2+}]_i$ Fluo-8 (Fluo-8 AM, ab142773, abcam). Al séptimo día de incubación, los explantes de ovario fueron expuestos a concentraciones subletales de la CL_{50} (1/4 y 1/8) por 24h. Transcurrido este tiempo, se quitó el perfluorado y se incubaron en 4µl/mL de fluo-8 AM (2µM) (Thermo Fisher Scientific) en solución salina balanceada de Hanks (HHSB) a 37°C, 5% CO_2 durante 1h. La concentración de $[Ca^{2+}]_i$ se determinó a partir de la proporción de la fluorescencia de fluo-8 a 520 nm excitando con luz UV a 490 nm, en microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axio Star Plus).

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron al menos en tres ensayos independientes y por duplicado cada uno de ellos. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante la prueba t de Student. Se tomaron valores con diferencias estadísticas aquellos con $P < 0.05$.

RESULTADOS

PRIMER OBJETIVO: Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) del PFHxS en ovocitos de ratón fetales *in vitro*.

Para la determinación de la CL₅₀ las concentraciones de PFHxS utilizadas fueron: 200, 300, 350, 400, 425, 450, 475, 500 y 600 μ M. Se decidió utilizar estas concentraciones con base en experimentos previos, no publicados todavía, en los que se observó que concentraciones más bajas de PFHxS no ocasionaba efectos de toxicidad en los ovocitos. Además, para descartar el posible efecto tóxico del diluyente DMSO 0.02% en la viabilidad de los ovocitos, se añadió un control del mismo en la mayor concentración utilizada para el PFHxS de 600 μ M.

En las Figuras 7 y 8, se observan los explantes de ovario de ratón fetal al 7° día de cultivo, antes de la exposición al PFHxS (T0) y 24 h después de la exposición al perfluorado (T24) de seis diferentes tratamientos. Al T0 se observa en cada explante una gran cantidad de ovocitos los cuales pueden identificarse como pequeñas esferas blancas en el centro de la imagen. En la figura 7, tanto el grupo testigo, así como el tratamiento con DMSO y con PFHxS a 350 μ M el número de ovocitos no disminuye después de 24 h de incubación, sin embargo, la cantidad de ovocitos se reduce drásticamente de manera dosis dependiente en los tratamientos de 400, 450 y 500 μ M (Figura 8). Esto se puede observar mejor en la figura 9. En esta gráfica se puede apreciar que la mortalidad de los ovocitos (eje de las Y) se incrementa proporcionalmente a la concentración del PFHxS (eje de las X). Entre el grupo testigo y en el tratamiento con DMSO no se observan diferencias significativas, lo que demuestra que el DMSO no tiene efecto citotóxico en los ovocitos. Tampoco se observa efecto en concentraciones menores de 200 y 300 μ M, siendo la dosis umbral de 350 μ M. Una diferencia estadísticamente significativa se observa a partir de 400 μ M en donde el efecto del PFHxS es notable.

A partir de estos datos se obtuvo una curva dosis-respuesta y se calculó la CL₅₀, la cual fue de 471.95 μ M (Fig. 10).

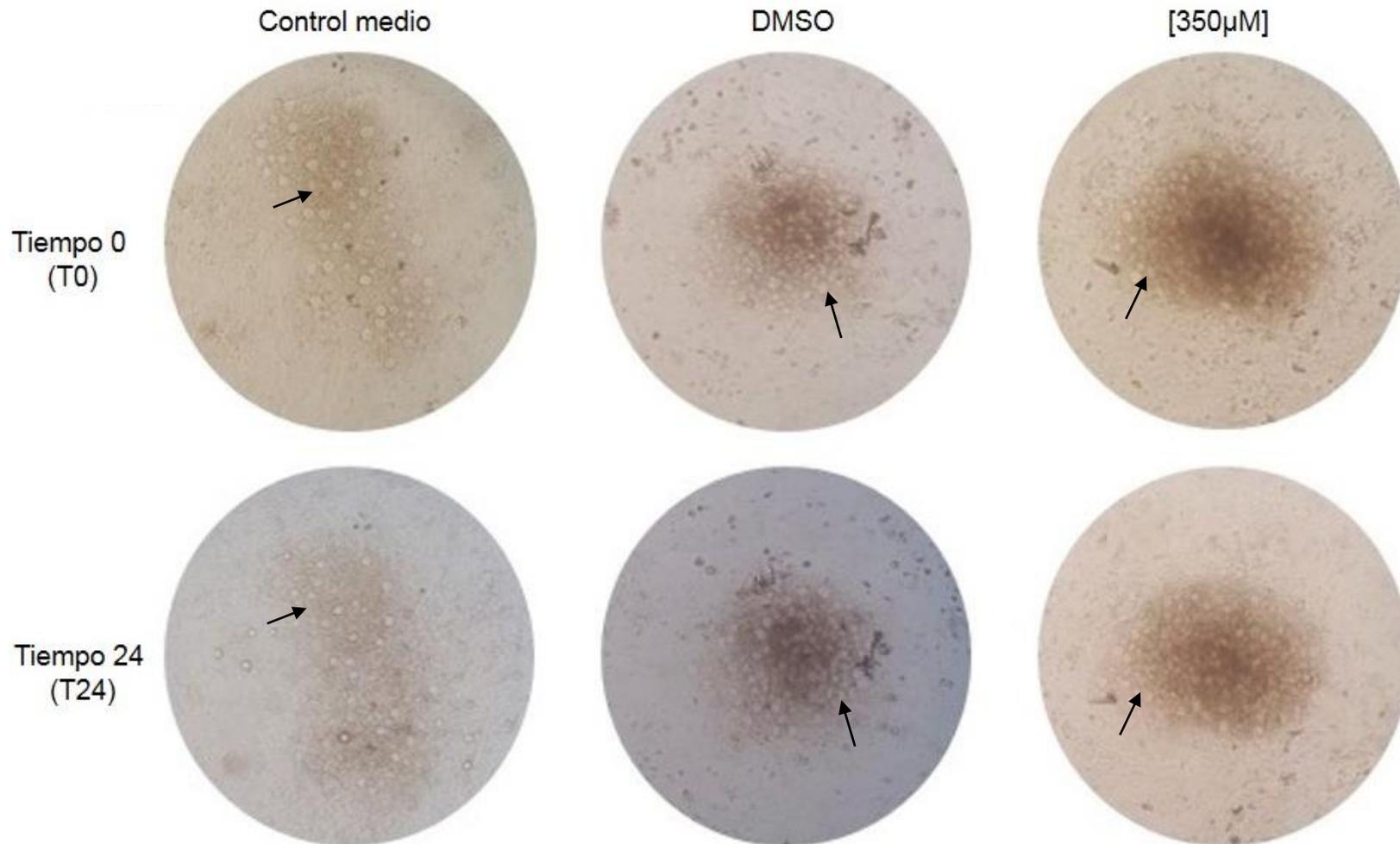


Figura 7. En el centro de la imagen se observan los explantes de los ovarios de ratones fetales (100X). Las flechas indican los nidos de ovocitos vivos característicos como pequeñas esferas blancas. No se observa efecto toxico tanto del DMSO como del PFHxS a 350 µM. T0, antes del tratamiento; T24, 24 h después del tratamiento; control medio, grupo testigo; DMSO, control con el vehículo; 350 µM, concentración el PFHxS.

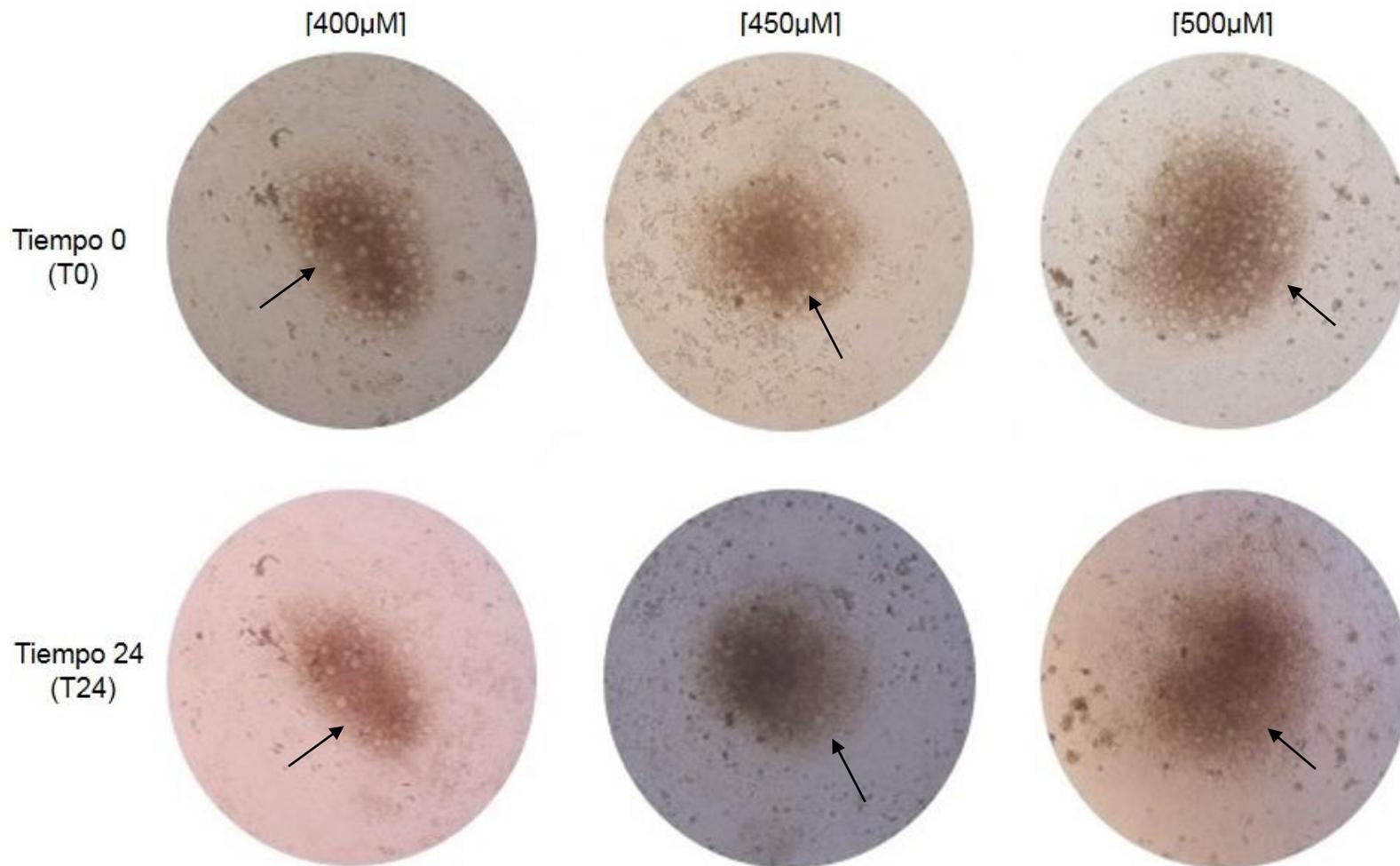


Figura 8. En el centro de la imagen se observan los explantes de los ovarios de ratones fetales (100X). Las flechas indican los nidos de ovocitos vivos característicos como pequeñas esferas blancas. Se observa efecto toxico del PFHxS de manera dosis dependiente. T0, antes del tratamiento; T24, 24 horas después del tratamiento; 400, 450 y 500 μ M, concentración el PFHxS

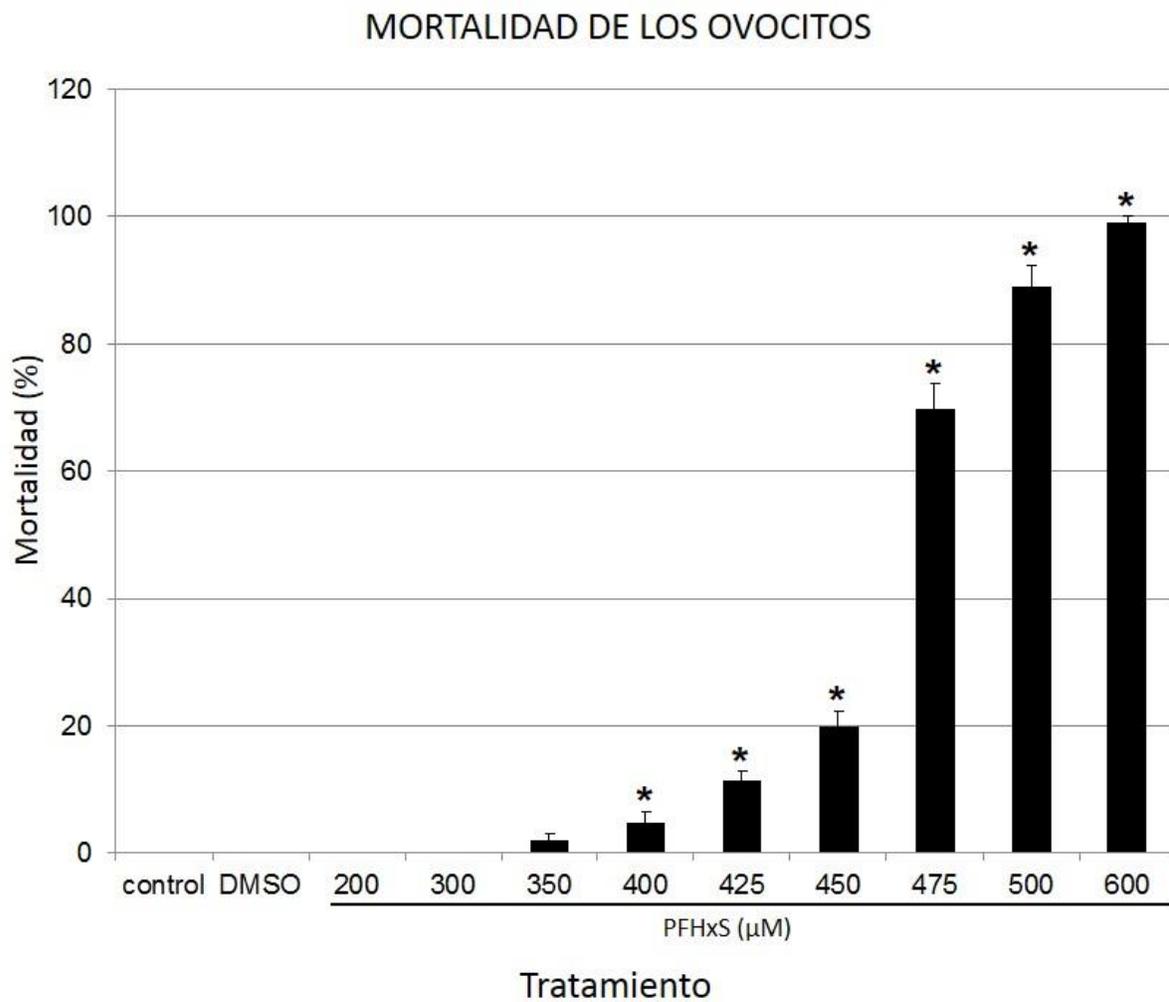


Figura 9. Porcentajes de mortalidad en ovocitos tratados con PFHxS y control (promedio \pm desviación estándar). Se observa que a partir de una concentración de 400 μ M existe citotoxicidad por parte del PFHxS de manera dosis dependiente. * Los asteriscos muestran las diferencias significativas con $P < 0.05$ respecto al control

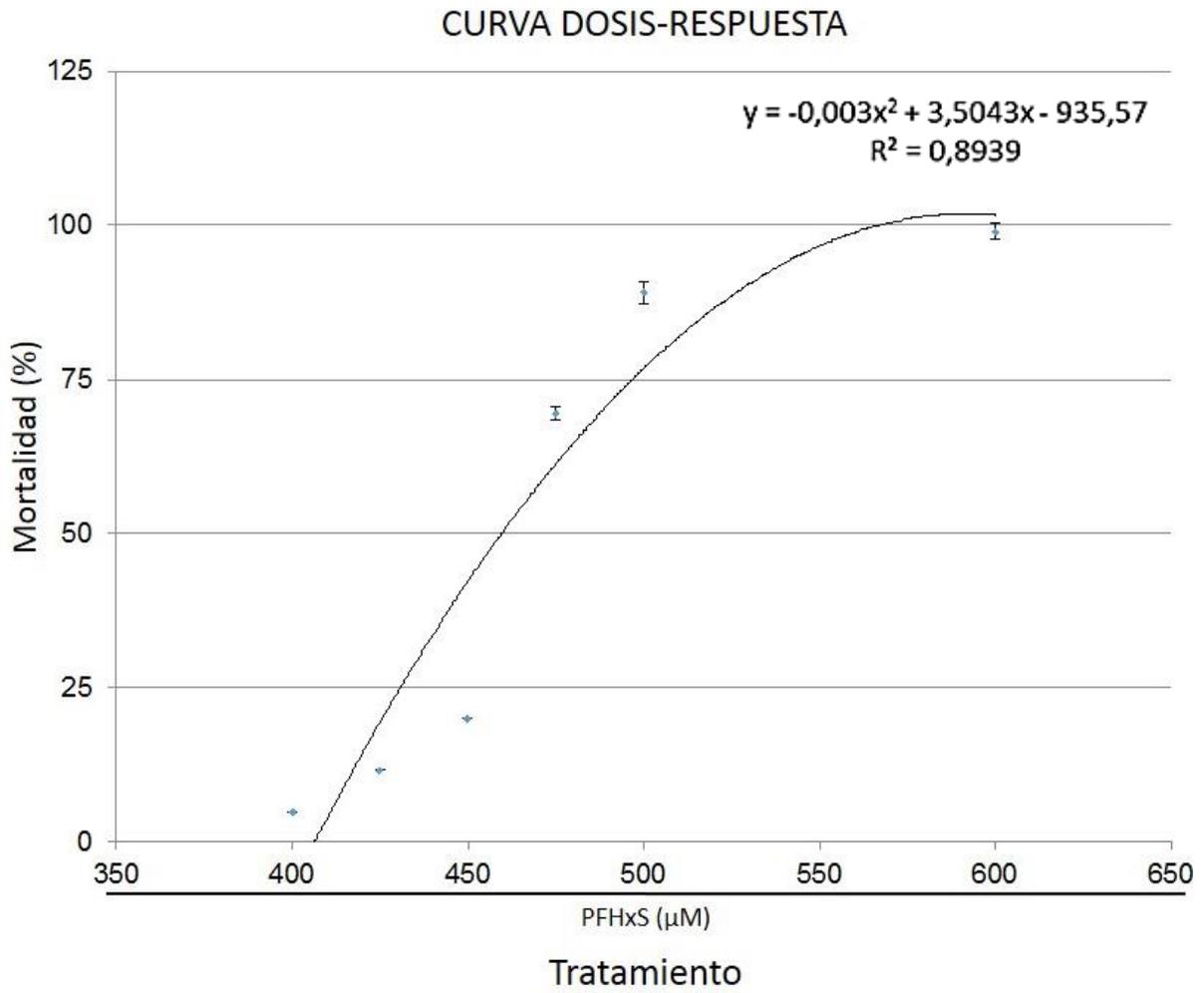


Figura 10. Curva dosis-respuesta. Mortalidad de los ovocitos expuestos a PFHxS. Análisis de regresión. A través de este análisis se logró encontrar la dosis en que se mueren el 50% de los ovocitos. r^2 0.8939.

SEGUNDO OBJETIVO: Determinación *in vitro* del efecto del PFHxS en las uniones comunicantes durante la ovogénesis temprana del ratón

Para alcanzar el segundo objetivo, ovarios fetales completos fueron cultivados *in vitro* en presencia de concentraciones crecientes de PFHxS y teñidos con calceína AM y Hoechst durante 15 minutos.

La calceína AM es un compuesto no fluorescente. Gracias a su derivado acetoximetilado (AM) es que puede ser absorbida por las células vivas a través de las uniones comunicantes. Una vez dentro de la célula, las enzimas esterases biotransforman la calceína AM en calceína, la cual es un colorante que si es fuertemente fluorescente. Debido a que las esterases son activas únicamente en células vivas el uso de la Calceína AM nos permite evaluar tanto la funcionalidad de las uniones comunicantes así como la viabilidad del tejido.

En la figura 11, del lado izquierdo, se observa la migración de la calceína a través de las uniones comunicantes en el tejido. En el grupo control (DMSO), se observa una amplia migración de la calceína a lo largo del tejido a través de las uniones comunicantes, sin embargo, a dosis de PFHxS de 117.98 μM , que corresponde a 1/8 de la CL_{50} y a 235.97 μM que corresponde a 1/4 de la CL_{50} , se observa una reducción en la migración de la calceína. Se utilizó como control positivo carbenoxolona (CBX), que es un inhibidor de uniones comunicantes. En la parte inferior de la misma figura, se puede observar el efecto de la carbenoxolona, el cual al inhibir las uniones comunicantes no permite observar que la fluorescencia migre en el tejido. En la misma figura, del lado derecho, se observa la tinción con el colorante Hoechst, el cual es un colorante que se une al ADN de células vivas. En todos los experimentos se puede observar la fluorescencia del Hoechst, indicando la viabilidad de las células en el tejido.

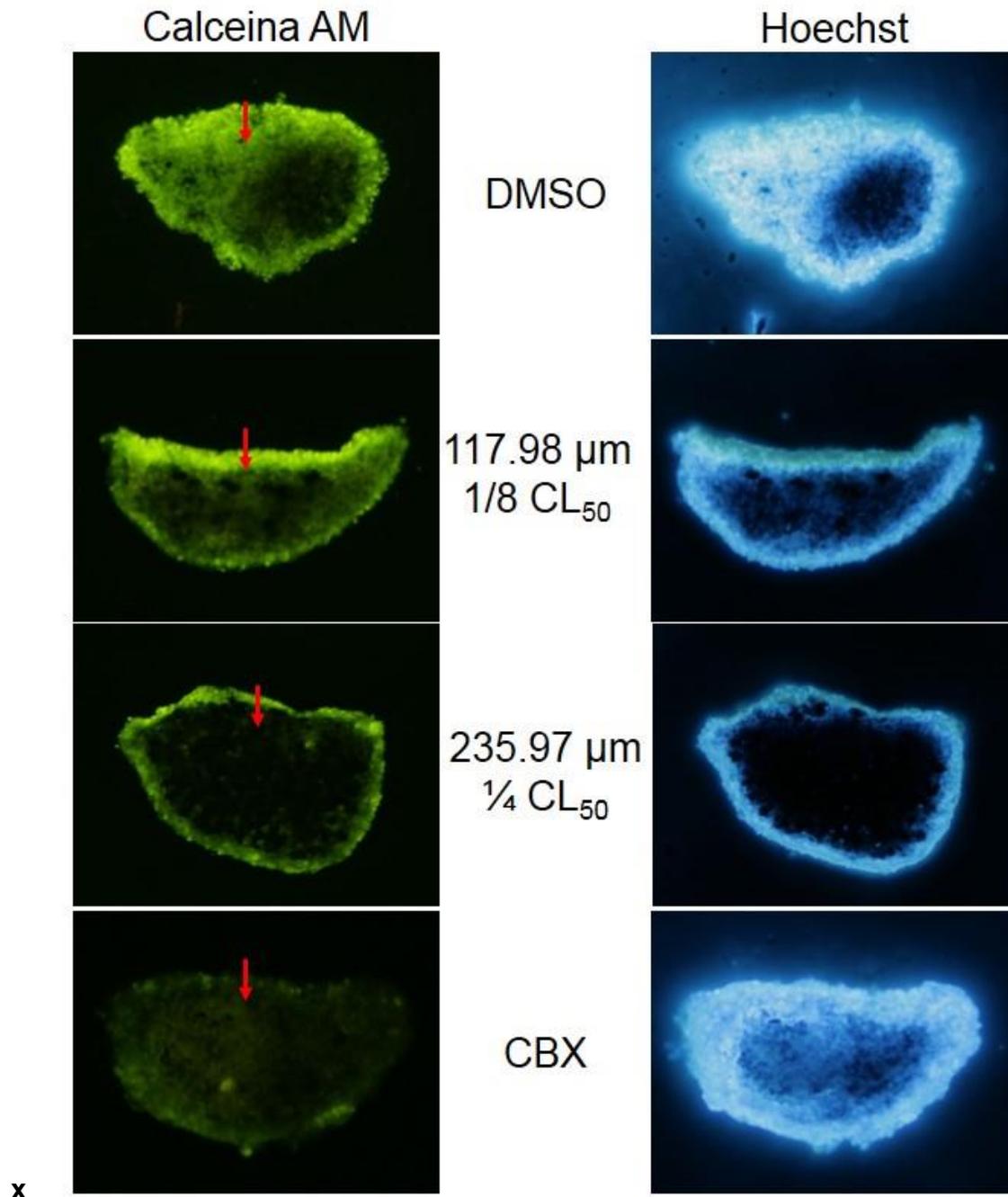


Figura 11. Cortes de ovario fetal de ratón tratados con calceína AM y Hoechst (100X). Lado izquierdo: cortes teñidos con calceína AM. Cada fotografía representa diferentes tratamientos: DMSO; PFHxS 117.98 μm , que corresponde a 1/8 de la CL_{50} ; PFHxS 235.97 μm , que corresponde a 1/4 de la CL_{50} ; carbenoxolona (CBX), un inhibidor de uniones comunicantes hacia el interior del ovario. Se observa una disminución en la migración de la calceína a medida que aumenta la concentración del PFHxS. Lado derecho: cortes teñidos con Hoechst

En la Figura 12 se muestra la distancia de difusión de la calceína a través de las uniones comunicantes. Se observa una diferencia significativa con el control a partir del tratamiento con 117.98 μM . La migración de la calceína se ve reducida de manera importante indicando el efecto tóxico del PFHxS en la funcionalidad de las uniones comunicantes.

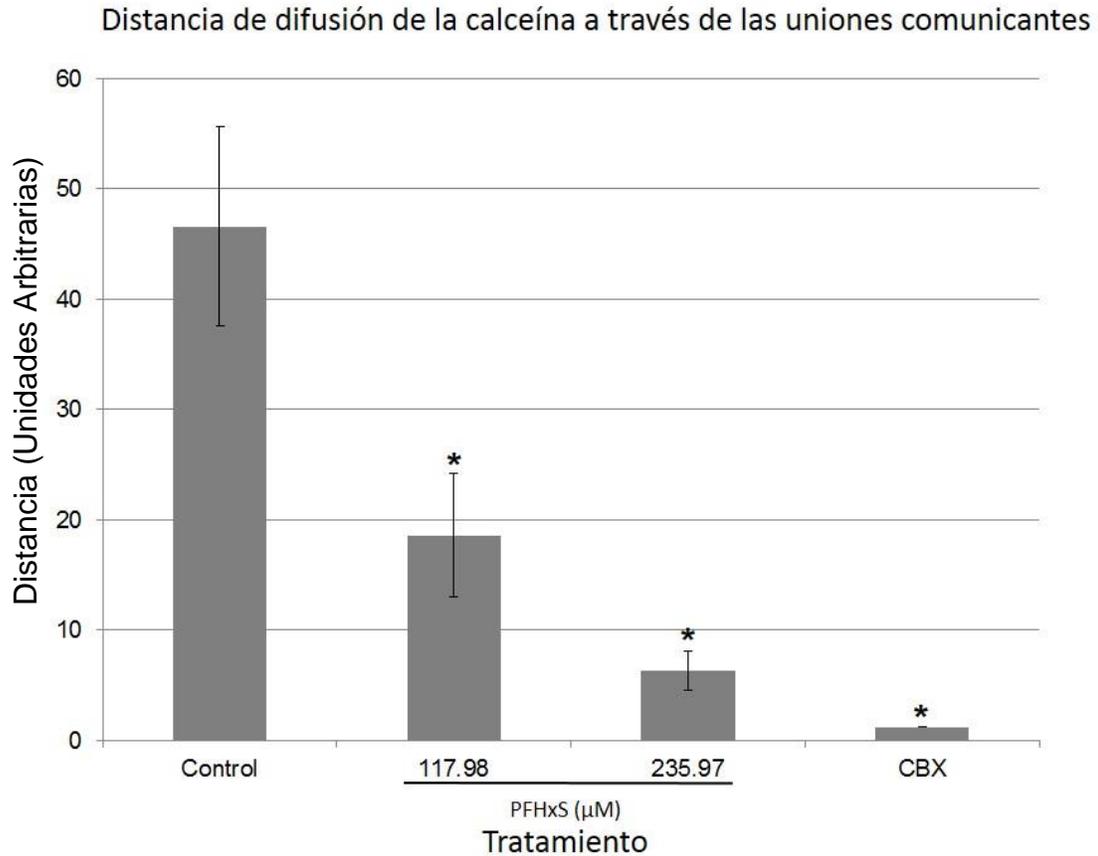


Figura 12. Se muestra la distancia de migración de la calceína (promedio \pm desviación estándar) a través de las uniones comunicantes. En el control, la distancia de migración es grande comparado con la distancia de migración de los explantes tratados con PFHxS, en donde se observa un claro efecto citotóxico por parte de perfluorado. En el tratamiento con carbenoxolona no se observa migración de la calceína debido a la inhibición de las uniones comunicantes. UA: unidades arbitrarias de distancia. * Los asteriscos muestran las diferencias significativas con $P < 0.05$ respecto al control.

TERCER OBJETIVO: Determinación del efecto del PFHxS en la homeostasis de Ca^{2+} en ovocitos de ratón fetales cultivados *in vitro*.

Para determinar el efecto del PFHxS en la homeostasis de calcio se llevó a cabo la metodología descrita utilizando fluo-8 AM como agente indicador de calcio intracelular. Los explantes de ovocitos se incubaron en 4 μl /ml de fluo-8 AM (2 μM) en solución salina balanceada de Hanks (HHSB) a 37°C, 5% CO_2 durante 1 hora

En la figura 13 se observa el marcaje del fluorocromo en los ovocitos. Del lado izquierdo de la imagen se observan los explantes de ovario en campo claro, mientras que del lado derecho de la imagen se observan los explantes una vez que fueron tratados con Fluo-8. En el control (DMSO) se puede observar una fluorescencia fuerte del fluo-8 en los ovocitos, indicando la presencia de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, en las imágenes inferiores, la fluorescencia del fluo-8 en los ovocitos es nula, lo cual indica el efecto tóxico del PFHxS a concentraciones subletales de la CL_{50} .

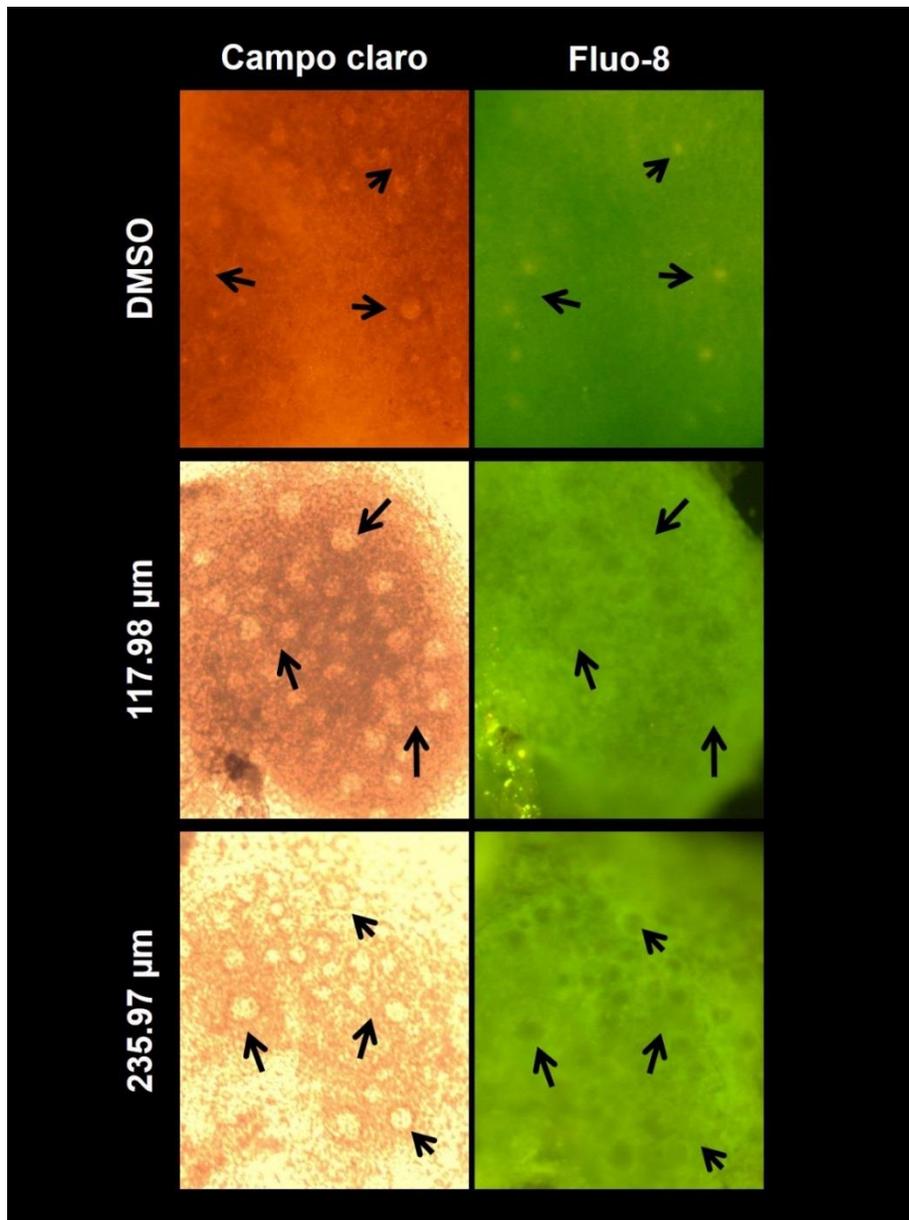


Figura 13. Explantes de ovario fetal de ratón teñidos con fluo-8 (400X). Izquierda, imagen en campo claro de los explantes de ovario; derecha, imagen de los explantes de ovario teñidos con fluo-8. Las flechas indican e lugar donde se encuentran los ovocitos. En el control se pueden apreciar la fluorescencia de los ovocitos teñidos con fluo-8, indicando la presencia de calcio. Al exponer a los explantes al PFHxS no se observa fluorescencia en los ovocitos, lo que indica la toxicidad del perfluorado en la homeostasis de calcio.

DISCUSIÓN

El PFHxS es uno de los PFCs más usados por más de 50 años en una variedad de aplicaciones industriales y de consumo tales como espumas contra incendios, telas y utensilios de cocina. Se ha detectado en diversas fuentes dietéticas, así como en polvo domestico principalmente de alfombras y tapicería. El creciente número de estudios de biomonitorio humano han demostrado la presencia de PFHxS en el suero de la población en general, así como en la sangre del cordón umbilical al nacimiento y en la leche materna, lo que indica que PFHxS es un contaminante ambiental ubicuo y su exposición puede ocurrir a lo largo de la vida. En particular, la exposición en la vida temprana ha planteado una gran preocupación por la salud. La vida media en suero de este compuesto ha sido estimada en 2665 días (Lee et al., 2014, Sundstrom et al., 2012).

Hoy en día, la exposición humana a los PFCs es omnipresente y comienza en forma prenatal, ya que han sido detectados en la placenta, dicha exposición ha sido relacionada con alteraciones hormonales, del desarrollo y reproductivas, entre otros.(Hansmeier et al., 2015, Jing et al., 2009, Ng y Hungerbuhler, 2014, Zlatnik, 2016) En el presente estudio se determinó que la CL_{50} para el PFHxS en ovocitos de ratón fetal *in vitro* es de 471.95 μ M. Esta concentración es mucho mayor a la reportada para este perfluorado en población humana laboralmente expuesta, que es de 3.23 μ M (Beesoon et al., 2010, Olsen et al., 2007). Por lo que de existir afectaciones reproductivas en organismos expuestos a compuestos perfluorados, estas no se deberían a una citotoxicidad ejercida por los compuestos.

Sin embargo, en un estudio realizado por Butenhoff et al., (2009), se observó que al administrar con dosis de 10 mg/kg de PFHxS por vía intraperitoneal a la rata hembra adulta, se lograba una concentración de este perfluorado en suero de 594 μ M. Tal concentración no produjo afectaciones histológicas en el ovario, particularmente en el número de folículos primordiales. Sin embargo, en el presente trabajo, usando como modelo al ratón, se determinó que la exposición aguda al PFHxS de ovocitos fetales causa toxicidad a partir de una concentración de 400 μ M, ocasionando muerte

de los ovocitos, lo que demuestra que la ovogénesis temprana es susceptible a la toxicidad del PFHxS en esta etapa del desarrollo.

En un trabajo realizado por Upham et al., (1998) se demuestra que la toxicidad de los PFCs depende del largo de la cadena de carbonos del perfluorado, siendo los de cadena larga más tóxicos (7 a 10 carbonos). Además en diferentes trabajos se ha mencionado que los principales fabricantes de productos químicos fluorados junto con los reguladores mundiales han acordado interrumpir la fabricación de productos fluorados de cadena larga y en su lugar fabrican sustancias fluoradas análogas de cadena corta como alternativas que se supone son menos peligrosas (Danish Ministry of the environment, 2015, Jensen et al., 2008, Poulsen PB et al., 2005). Al respecto sin embargo, en nuestro sistema *in vitro*, la exposición directa de los ovocitos al PFHxS también induce toxicidad, a pesar de que este es un compuesto perfluorado considerado de cadena corta (6 carbonos), por lo que este trabajo podría considerarse como referencia para estudios posteriores relacionados con la citotoxicidad de ovocitos y problemas relacionados con la fertilidad.

El funcionamiento de las uniones comunicantes es importante para el mantenimiento de la homeostasis en los organismos multicelulares y la disrupción de éstas puede llevar a múltiples enfermedades (Upham et al., 2009).

En el folículo ovárico, las uniones comunicantes facilitan al ovocito la absorción de nutrientes tales como aminoácidos provenientes de las células somáticas y median la cooperación metabólica entre el ovocito y sus células somáticas acompañantes. Este tipo de comunicación también puede jugar un papel en la coordinación del crecimiento folicular y de la producción de hormonas esteroides. Las uniones comunicantes pueden regular el arresto meiótico del ovocito en el folículo a través de los niveles de AMPc, este segundo mensajero puede ser transferido desde la granulosa hasta el ovocito a través de las uniones comunicantes. Además también juega un papel en la maduración final del ovocito por las vías de señalización inducidas por LH. (Wright et al., 2001)

En el presente estudio se determinó la funcionalidad de las uniones comunicantes en el ovario de ratón fetal después de la exposición aguda a PFHxS. El

PFHxS claramente interrumpe las uniones comunicantes en el ovario de ratón fetal a una concentración de 117.98 μM después de una exposición aguda de 24h. En estudios anteriores realizados por Upham et al., (1998) se encontró que algunos PFCs son capaces de inhibir las uniones comunicantes de manera dosis-dependiente. Ellos demostraron en células epiteliales de hígado de rata que el potencial inhibitorio de los PFCs dependía de la longitud de la cadena de carbonos. Los PFCs de cadenas de 7 a 10 carbonos son capaces de inhibir las uniones comunicantes a concentraciones de 50 μM (25 mg/L), mientras que los PFCs de 2 a 5 carbonos no, esto debido a que los PFCs de 7 a 10 carbonos son capaces de unirse a receptor específicos que puede formar un ligando con los PFCs inhibitorios, dando como resultado la activación de una vía reguladora de GJIC. También observaron que esta inhibición ocurría durante 15 minutos y que el efecto se revierte a los 30 minutos después de remover el perfluorado del medio de cultivo; con lo anterior, los autores proponen que las uniones comunicantes se modifican a nivel post-transcripcional, o por el efecto de cinasas.

Sin embargo, en otros estudios se determinó la concentración efectiva media (EC_{50}) de varios PFCs a la que inhibían las uniones comunicantes en células de hígado de rata y riñón de delfín, siendo para el PFHxS de 121.5 μM y 85.63 μM respectivamente (Hu et al., 2002), concentraciones que se aproximan a las probadas en este estudio que son de 117.98 μM para ovario de ratón fetal. Por otro lado, se ha comprobado que, en el ovocito de cerdo, existen efectos de PFOS en la viabilidad y las uniones comunicantes con una CL_{50} de 32 μM y una concentración de inhibición de maduración de 22 μM (Dominguez et al., 2016). En dicho estudio se evaluaron las uniones comunicantes entre células de la granulosa y ovocito y se determinó que el PFOS ejerce un efecto inhibitorio durante las primeras 8h de maduración, sin embargo se demostró que éste no se debió a la alteración en la expresión de las conexinas 43, 45 o 60. Este experimento demostró el potencial de riesgo al cual el ovocito está sometido que junto con los experimentos anteriores, se puede proponer que el efecto varía entre especies y tipo celular y que el efecto potencial entre especies implica un riesgo en la salud de organismos multicelulares.

La regulación de las uniones comunicantes se da a diferentes niveles del control celular; mutación de los genes que codifican conexinas o reducción en su expresión genética; incremento en la degradación del RNAm, fosforilación de las conexinas así como unión de agentes químicos a las conexinas (Hu et al., 2002). En el presente trabajo se demuestra una alteración en la funcionalidad de las uniones comunicantes ejercida por el PFHxS, lo que podría implicar que el ovocito no reciba el correcto suministro de nutrientes ni los factores de señalización necesarios para que pueda llevar a cabo el proceso de maduración, sin embargo, se necesitan más experimentos para determinar los mecanismos de acción por los cuales se lleva a cabo esta disrupción en el modelo de ovario fetal *in vitro*.

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular omnipresente que es importante para la progresión del ciclo celular. La evidencia genética y bioquímica apoya el papel del Ca^{2+} en la mitosis. También algunos estudios muestran que Ca^{2+} modula tanto la maquinaria del ciclo celular como la maduración nuclear durante la meiosis (Sun y Machaca, 2004). En muchas especies estudiadas hasta el momento, los puntos de control del ciclo celular meiótico y mitótico son desencadenados por aumentos en el calcio intracelular (Homa, 1995). Estudios demuestran que existe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el ovocito inmaduro de la estrella de mar, sin embargo, las oscilaciones de calcio parecen tener lugar una vez que el ovocito inicia la reanudación de la meiosis (Chiba et al., 1990), mientras que en mamíferos, la información acerca de las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y su participación antes de la maduración del ovocito es escasa. En este estudio se determinó que existe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el ovocito de ratón fetal antes de la maduración, y que el PFHxS a una concentración de 117.95 μM causa una disminución en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Cabe destacar que la importancia en la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} radica en que algunos estudios han descrito que el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el mecanismo universal que subyace en la reanudación meiótica en la maduración de ovocitos (Carroll et al., 1994, Homa, 1995), por lo que si no existe ese aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el ovocito, éste no podrá llevar a cabo la reanudación de la meiosis y el consiguiente proceso de maduración.

Sin embargo, hacen falta más estudios para determinar las concentraciones basales del calcio en esta etapa de la meiosis, así como determinar los mecanismos moleculares por los cuales el PFHxS ejerce sus efectos tóxicos sobre el ovocito y sobre la homeostasis de Ca^{2+} .

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La CL₅₀ de PFHxS en ovocitos fetales de ratón *in vitro*, determinada en este estudio es de 471.95 μM , muy por encima de la mayor concentración reportada en suero de trabajadoras laboralmente expuestas que es de 3.23 μM (Olsen et al., 2007). Por lo que las posibles afectaciones reproductivas pueden no deberse a la citotoxicidad de los ovocitos, en este sentido, se analizaron otras afectaciones como la función de uniones comunicantes y homeostasis de calcio.

Sin embargo, no se puede descartar un impacto negativo probable del PFHxS en la ovogénesis *in vivo*, ya que en éste estudio la exposición al perfluorado fue aguda (24h), en tanto que las mujeres se encuentran expuestas permanentemente y el efecto de una exposición crónica aún no han sido estudiados.

El PFHxS inhibe las uniones comunicantes y altera la homeostasis de Ca^{2+} de ovario fetal de ratón a 117.98 μM , que corresponde a $\frac{1}{4}$ de la CL₅₀ reportada en este estudio. Aunque a esta concentración el PFHxS no altera la viabilidad del ovocito, se demuestra que es suficiente para ocasionar daños severos en la regulación de segundos mensajeros importantes para la regulación de la maduración del ovocito.

Es necesario realizar más estudios para localizar el nivel al cual se lleva a cabo la inhibición de las uniones comunicantes, ya sea por cambios en la estructura de las conexinas o fosforilación de las mismas y verificar si no existe una modulación en la regulación de la expresión génica o a nivel de síntesis de proteínas

De igual manera, es necesario conocer los mecanismos que interfieren en la homeostasis de calcio de los ovocitos y conocer cuáles son las posibles implicaciones de ésta.

BIBLIOGRAFÍA

- Annamalai, J. y V. Namasivayam (2015). "Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife." *Environ Int* **76**: 78-97.
- Arellano, R. O., A. Martinez-Torres y E. Garay (2002). "Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte." *Biol Reprod* **67**(3): 837-846.
- Bach, C. C., A. Vested, K. T. Jorgensen, J. P. Bonde, T. B. Henriksen y G. Toft (2016). "Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and measures of human fertility: a systematic review." *Crit Rev Toxicol* **46**(9): 735-755.
- Barmentlo, S. H., J. M. Stel, M. van Doorn, C. Eschauzier, P. de Voogt y M. H. Kraak (2015). "Acute and chronic toxicity of short chained perfluoroalkyl substances to *Daphnia magna*." *Environ Pollut* **198**: 47-53.
- Barrio, L. C. y D. González-Nieto (2012). "Conectados por conexinas: comunicación intercelular mediada por canales de conexinas y enfermedades asociadas a mutaciones en los genes de conexina." *The spanish ion channel initiative* **79**: 75-91.
- Beesoon, S., J. S. Genuis, J. P. Benskin y J. W. Martin (2010). "Abnormally high serum levels of Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) in a canadian family - A case study." *Organohalogen Compounds* **72**: 1460-1463.
- Beesoon, S., S. J. Genuis, J. P. Benskin y J. W. Martin (2012). "Exceptionally high serum concentrations of perfluorohexanesulfonate in a Canadian family are linked to home carpet treatment applications." *Environ Sci Technol* **46**(23): 12960-12967.
- Ben-Ami, I., S. Freimann, L. Armon, A. Dantes, R. Ron-El y A. Amsterdam (2006). "Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches." *Mol Hum Reprod* **12**(7): 413-419.

- Bijland, S., P. C. Rensen, E. J. Pieterman, A. C. Maas, J. W. van der Hoorn, M. J. van Erk, L. M. Havekes, K. Willems van Dijk, S. C. Chang, D. J. Ehresman, J. L. Butenhoff y H. M. Princen (2011). "Perfluoroalkyl sulfonates cause alkyl chain length-dependent hepatic steatosis and hypolipidemia mainly by impairing lipoprotein production in APOE*3-Leiden CETP mice." *Toxicol Sci* **123**(1): 290-303.
- Bornslaeger, E. A. y R. M. Schultz (1985). "Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels." *Biol Reprod* **33**(3): 698-704.
- Brower, P. T. y R. M. Schultz (1982). "Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth." *Dev Biol* **90**(1): 144-153.
- Buck, R. C., J. Franklin, U. Berger, J. M. Conder, I. T. Cousins, P. de Voogt, A. A. Jensen, K. Kannan, S. A. Mabury y S. P. van Leeuwen (2011). "Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins." *Integr Environ Assess Manag* **7**(4): 513-541.
- Butenhoff, J. L., S. C. Chang, D. J. Ehresman y R. G. York (2009). "Evaluation of potential reproductive and developmental toxicity of potassium perfluorohexanesulfonate in Sprague Dawley rats." *Reprod Toxicol* **27**(3-4): 331-341.
- Calafat, A. M., Z. Kuklennyik, J. A. Reidy, S. P. Caudill, J. S. Tully y L. L. Needham (2007). "Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the u.s. population: data from the national health and nutrition examination survey (NHANES)." *Environ Sci Technol* **41**(7): 2237-2242.
- Carroll, J., K. Swann, D. Whittingham y M. Whitaker (1994). "Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca²⁺]_i oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes." *Development* **120**(12): 3507-3517.
- Cassone, C. G., V. Vongphachan, S. Chiu, K. L. Williams, R. J. Letcher, E. Pelletier, D. Crump y S. W. Kennedy (2012). "In ovo effects of perfluorohexane sulfonate and perfluorohexanoate on pipping success, development, mRNA

expression, and thyroid hormone levels in chicken embryos." *Toxicol Sci* **127**(1): 216-224.

- Colonna, R. y F. Mangia (1983). "Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes." *Biol Reprod* **28**(4): 797-803.
- Conder, J. M., R. A. Hoke, W. De Wolf, M. H. Russell y R. C. Buck (2008). "Are PFCA's bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds." *Environ Sci Technol* **42**(4): 995-1003.
- Cheon, B., H. C. Lee, T. Wakai y R. A. Fissore (2013). "Ca²⁺ influx and the store-operated Ca²⁺ entry pathway undergo regulation during mouse oocyte maturation." *Mol Biol Cell* **24**(9): 1396-1410.
- Chernorudskiy, A. L. y E. Zito (2017). "Regulation of Calcium Homeostasis by ER Redox: A Close-Up of the ER/Mitochondria Connection." *J Mol Biol* **429**(5): 620-632.
- Chiba, K., R. T. Kado y L. A. Jaffe (1990). "Development of calcium release mechanisms during starfish oocyte maturation." *Dev Biol* **140**(2): 300-306.
- Danish Ministry of the environment (2015). Short-chain Polyfluoroalkyl Substances (PFAS). Denmark, The Danish Environmental Protection Agency.
- Dominguez, A., Z. Salazar, E. Arenas, M. Betancourt, Y. Ducolomb, H. Gonzalez-Marquez, E. Casas, M. Teteltitla y E. Bonilla (2016). "Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro." *Toxicol In Vitro* **35**: 93-99.
- Downs, S. M. (1995). "The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte." *Dev Biol* **167**(2): 502-512.
- Eppig, J. J., F. L. Pendola, K. Wigglesworth y J. K. Pendola (2005). "Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport." *Biol Reprod* **73**(2): 351-357.

- Fernández-Barocio, F. y M. d. C. S. Sánchez-Villegas (2013). "Epidemiología de las intoxicaciones en el Servicio de Urgencias Pediátricas de un Hospital de Tercer Nivel. Reporte de cinco años." *Archivos de Medicina de Urgencia de México* **5**(1): 18-24.
- Gorrochategui, E., E. Perez-Albaladejo, J. Casas, S. Lacorte y C. Porte (2014). "Perfluorinated chemicals: differential toxicity, inhibition of aromatase activity and alteration of cellular lipids in human placental cells." *Toxicol Appl Pharmacol* **277**(2): 124-130.
- Governini, L., R. Orvieto, C. Guerranti, L. Gambera, V. De Leo y P. Piomboni (2011). "The impact of environmental exposure to perfluorinated compounds on oocyte fertilization capacity." *J Assist Reprod Genet* **28**(5): 415-418.
- Haghghat, N. y L. J. Van Winkle (1990). "Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly." *J Exp Zool* **253**(1): 71-82.
- Hansmeier, N., T. C. Chao, J. B. Herbstman, L. R. Goldman, F. R. Witter y R. U. Halden (2015). "Elucidating the molecular basis of adverse health effects from exposure to anthropogenic polyfluorinated compounds using toxicoproteomic approaches." *J Proteome Res* **14**(1): 51-58.
- He, C. L., P. Damiani, J. B. Parys y R. A. Fissore (1997). "Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes." *Biol Reprod* **57**(5): 1245-1255.
- Heller, D. T., D. M. Cahill y R. M. Schultz (1981). "Biochemical studies of mammalian oogenesis: metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes." *Dev Biol* **84**(2): 455-464.
- Heller, D. T. y R. M. Schultz (1980). "Ribonucleoside metabolism by mouse oocytes: metabolic cooperativity between the fully grown oocyte and cumulus cells." *J Exp Zool* **214**(3): 355-364.
- Homa, S. T. (1995). "Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte." *Mol Reprod Dev* **40**(1): 122-134.

- Hu, W., P. D. Jones, B. L. Upham, J. E. Trosko, C. Lau y J. P. Giesy (2002). "Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated compounds in rat liver and dolphin kidney epithelial cell lines in vitro and Sprague-Dawley rats in vivo." *Toxicol Sci* **68**(2): 429-436.
- Inoue, K., F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, S. Nakajima, A. Uno, Y. Saijo, F. Sata, Y. Yoshimura, R. Kishi y H. Nakazawa (2004). "Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy." *Environ Health Perspect* **112**(11): 1204-1207.
- Jacquet, N., M. A. Maire, Y. Landkocz y P. Vasseur (2012). "Carcinogenic potency of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on Syrian hamster embryo (SHE) cells." *Arch Toxicol* **86**(2): 305-314.
- Jensen, A., P. Poulsen y R. Bossi (2008). Survey and environmental/health assessment of fluorinated substances in im-pregnated consumer products and impregnating agents. Survey of Chemical Substances in Consumer Products. Denmark, The Danish Environmental Protection Agency.
- Jing, P., P. J. Rodgers y S. Amemiya (2009). "High lipophilicity of perfluoroalkyl carboxylate and sulfonate: implications for their membrane permeability." *J Am Chem Soc* **131**(6): 2290-2296.
- Johansson, N., P. Eriksson y H. Viberg (2009). "Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain." *Toxicol Sci* **108**(2): 412-418.
- Juszczak, G. R. y A. H. Swiergiel (2009). "Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**(2): 181-198.
- Keil, D. E., T. Mehlmann, L. Butterworth y M. M. Peden-Adams (2008). "Gestational exposure to perfluorooctane sulfonate suppresses immune function in B6C3F1 mice." *Toxicol Sci* **103**(1): 77-85.

- Kibschull, M., A. Gellhaus, D. Carette, D. Segretain, G. Pointis y J. Gilleron (2015). "Physiological roles of connexins and pannexins in reproductive organs." *Cell Mol Life Sci* **72**(15): 2879-2898.
- Kidder, G. M. y B. C. Vanderhyden (2010). "Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence." *Can J Physiol Pharmacol* **88**(4): 399-413.
- Kleszczynski, K. y A. C. Skladanowski (2011). "Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. III. Disturbance in Ca(2)+ homeostasis." *Toxicol Appl Pharmacol* **251**(2): 163-168.
- Kleszczynski, K., P. Stepnowski y A. C. Skladanowski (2009). "Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids II. Disruption of mitochondrial bioenergetics." *Toxicol Appl Pharmacol* **235**(2): 182-190.
- Konkel, L. (2014). "PFCs and early menopause: association raises questions about causality." *Environ Health Perspect* **122**(2): A59.
- Kristensen, S. L., C. H. Ramlau-Hansen, E. Ernst, S. F. Olsen, J. P. Bonde, A. Vested, T. I. Halldorsson, G. Becher, L. S. Haug y G. Toft (2013). "Long-term effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances on female reproduction." *Hum Reprod* **28**(12): 3337-3348.
- Lau, C., K. Anitole, C. Hodes, D. Lai, A. Pfahles-Hutchens y J. Seed (2007). "Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings." *Toxicol Sci* **99**(2): 366-394.
- Lee, Y. J., S. Y. Choi y J. H. Yang (2014). "PFHxS induces apoptosis of neuronal cells via ERK1/2-mediated pathway." *Chemosphere* **94**: 121-127.
- Liu, C. F., C. Liu y H. H. Yao (2010). "Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo." *Curr Top Dev Biol* **90**: 263-290.
- Lyngso, J., C. H. Ramlau-Hansen, B. B. Hoyer, H. Stovring, J. P. Bonde, B. A. Jonsson, C. H. Lindh, H. S. Pedersen, J. K. Ludwicki, V. Zvezdai y G. Toft (2014). "Menstrual cycle characteristics in fertile women from Greenland, Poland

and Ukraine exposed to perfluorinated chemicals: a cross-sectional study." *Hum Reprod* **29**(2): 359-367.

- Moor, R. M., M. W. Smith y R. M. Dawson (1980). "Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers." *Exp Cell Res* **126**(1): 15-29.
- Nelson, J. W., E. E. Hatch y T. F. Webster (2010). "Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and cholesterol, body weight, and insulin resistance in the general U.S. population." *Environ Health Perspect* **118**(2): 197-202.
- Ng, C. A. y K. Hungerbuhler (2014). "Bioaccumulation of perfluorinated alkyl acids: observations and models." *Environ Sci Technol* **48**(9): 4637-4648.
- Norris, R. P., W. J. Ratzan, M. Freudzon, L. M. Mehlmann, J. Krall, M. A. Movsesian, H. Wang, H. Ke, V. O. Nikolaev y L. A. Jaffe (2009). "Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte." *Development* **136**(11): 1869-1878.
- Olsen, G. W., J. M. Burris, D. J. Ehresman, J. W. Froehlich, A. M. Seacat, J. L. Butenhoff y L. R. Zobel (2007). "Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers." *Environ Health Perspect* **115**(9): 1298-1305.
- Patel, D., X. Zhang y R. D. Veenstra (2014). "Connexin hemichannel and pannexin channel electrophysiology: how do they differ?" *FEBS Lett* **588**(8): 1372-1378.
- Paul, A. G., K. C. Jones y A. J. Sweetman (2009). "A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate." *Environ Sci Technol* **43**(2): 386-392.
- Poulsen PB, Jensen AA y Wallström E (2005). *More environmentally friendly alternatives to PFOS-compounds and PFOA*. Denmark, The Danish Environmental Protection Agency.
- Rey, R. (2001) "Diferenciación sexual embrio-fetal: de las moléculas a la anatomía." *Revista chilena de anatomía* **19**, 75-82.

- Richard, S. y J. M. Baltz (2014). "Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocyte complex." *Biol Reprod* **90**(6): 137.
- Robert, E. (2001). "Evaluación del riesgo reproductivo desde las perspectivas clínicay de salud pública." *Revista de Dismorfología y Epidemiología* **4**(6): 23-26.
- Salame-Méndez, A., J. L. Gómez-Olivares, R. Valencia-Quintana, A. Castro-Campillo, J. Ramírez-Pulido, M. D. García-Suárez y H. Serrano (2010). "Xenobióticos: una paradoja biomédica." *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ*. **3**(1): 45-50.
- Salustri, A., S. Petrunaro, M. De Felici, M. Conti y G. Siracusa (1985). "Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured in vitro." *Biol Reprod* **33**(4): 797-802.
- Sarraj, M. A. y A. E. Drummond (2012). "Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease." *Reproduction* **143**(2): 151-163.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband y K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nat Methods* **9**(7): 671-675.
- Serrano, N. O., M. F. F. Cabrera y P. M. Olmedo (2001). "Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. I Estrógenos naturales." *Revista de Salud Ambiental* **1**(1).
- Sohlenius, A. K., K. Andersson, A. Bergstrand, O. Spydevold y J. W. De Pierre (1994). "Effects of perfluorooctanoic acid--a potent peroxisome proliferator in rat--on Morris hepatoma 7800C1 cells, a rat cell line." *Biochim Biophys Acta* **1213**(1): 63-74.
- Stanfield, C. L. (2016). *Principles of Human Physiology*, Pearson Education.

- Sun, L. y K. Machaca (2004). "Ca(2+)(cyt) negatively regulates the initiation of oocyte maturation." *J Cell Biol* **165**(1): 63-75.
- Sundstrom, M., S. C. Chang, P. E. Noker, G. S. Gorman, J. A. Hart, D. J. Ehresman, A. Bergman y J. L. Butenhoff (2012). "Comparative pharmacokinetics of perfluorohexanesulfonate (PFHxS) in rats, mice, and monkeys." *Reprod Toxicol* **33**(4): 441-451.
- Taylor, K. W., K. Hoffman, K. A. Thayer y J. L. Daniels (2014). "Polyfluoroalkyl chemicals and menopause among women 20-65 years of age (NHANES)." *Environ Health Perspect* **122**(2): 145-150.
- Tchernitchin, D. A. N. y S. M. A. Mena (2006). "Efectos diferidos de contaminantes ambientales y otros agentes en salud reproductiva y sexualidad: un desafío pendiente de la toxicología de la reproducción para la salud de las futuras generaciones." *Cuad Méd Soc (Chile)* **46**(3).
- Teteltitla, M. (2014). "evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcinos expuestos a sulfonato de perfluoroactano (PFOS) in vitro". Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Tosti, E. (2006). "Calcium ion currents mediating oocyte maturation events." *Reprod Biol Endocrinol* **4**: 26.
- United States Environmental Protection Agency. (2016). "Long-chain perfluorinated chemicals (PFCs) action plan." Retrieved Febrero 28, 2017, from <https://www.epa.gov/chemical-research/research-and-polyfluoroalkyl-substances-pfas>.
- Upham, B. L., N. D. Deocampo, B. Wurl y J. E. Trosko (1998). "Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail." *Int J Cancer* **78**(4): 491-495.
- Upham, B. L., J. S. Park, P. Babica, I. Sovadinova, A. M. Rummel, J. E. Trosko, A. Hirose, R. Hasegawa, J. Kanno y K. Sai (2009). "Structure-activity-dependent regulation of cell communication by perfluorinated fatty acids using in vivo and in vitro model systems." *Environ Health Perspect* **117**(4): 545-551.

- Vagi, S. J., E. Azziz-Baumgartner, A. Sjodin, A. M. Calafat, D. Dumesic, L. Gonzalez, K. Kato, M. J. Silva, X. Ye y R. Azziz (2014). "Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol A in polycystic ovary syndrome: a case-control study." *BMC Endocr Disord* **14**: 86.
- Velez, M. P., T. E. Arbuckle y W. D. Fraser (2015). "Maternal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fecundity: the MIREC study." *Hum Reprod* **30**(3): 701-709.
- Vitullo, A. D. (2016). Diferenciación celular en el ovario: nuevos conceptos en la formación de la línea germinal femenina en mamíferos. 4to Congreso Argentino de Microscopía - SAMIC, Bariloche - Argentina, SAMIC.
- Vongphachan, V., C. G. Cassone, D. Wu, S. Chiu, D. Crump y S. W. Kennedy (2011). "Effects of perfluoroalkyl compounds on mRNA expression levels of thyroid hormone-responsive genes in primary cultures of avian neuronal cells." *Toxicol Sci* **120**(2): 392-402.
- Wakai, T. y R. A. Fissore (2013). "Ca(2+) homeostasis and regulation of ER Ca(2+) in mammalian oocytes/eggs." *Cell Calcium* **53**(1): 63-67.
- Winterhager, E. y G. M. Kidder (2015). "Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health." *Hum Reprod Update* **21**(3): 340-352.
- Wolf, C. J., J. E. Schmid, C. Lau y B. D. Abbott (2012). "Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) by perfluoroalkyl acids (PFAAs): further investigation of C4-C12 compounds." *Reprod Toxicol* **33**(4): 546-551.
- Wolf, C. J., M. L. Takacs, J. E. Schmid, C. Lau y B. D. Abbott (2008). "Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptor alpha by perfluoroalkyl acids of different functional groups and chain lengths." *Toxicol Sci* **106**(1): 162-171.

BIBLIOGRAFÍA

- Wright, C. S., D. L. Becker, J. S. Lin, A. E. Warner y K. Hardy (2001). "Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation." *Reproduction* **121**(1): 77-88.
- Zlatnik, M. G. (2016). "Endocrine-Disrupting Chemicals and Reproductive Health." *J Midwifery Womens Health* **61**(4): 442-455.