



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A BAJA CONCENTRACIÓN DE PLOMO POR TRES  
GENERACIONES: EFECTOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS EN GÓNADAS DE  
HEMBRAS DE RATONES CD1**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

SELENE KARINNA TRUJILLO VÁZQUEZ

Matrícula 2183801981

COMITÉ TUTORAL

Dr. José Luis Gómez Olivares (Codirector)

Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana (Codirector)

Dr. Edmundo Bonilla González (Asesor)

Ciudad de México, 2023

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de “Biomembranas”, “Bioenergética y envejecimiento celular”, pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa; en la “Unidad de investigación médica en bioquímica” del Hospital de especialidades, Centro Médico Nacional siglo XXI, en el “Laboratorio 1” del departamento de farmacobiología localizado en el CINVESTAV sede sur, y el “Departamento de Investigación Básica” del Instituto Nacional de Geriátrica, bajo la dirección del Dr. José Luis Gómez Olivares del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, y del Dr. Rafael Valencia Quintana del Laboratorio de Toxicología Genómica y Química Ambiental, de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Edmundo Bonilla González, del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud.

La autora agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 637165, que comprendió del periodo de 01 de octubre de 2018 al 30 de septiembre de 2022. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del CONACyT, con número de referencia 001480.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

M. en B. Selene Karinna Trujillo Vázquez

El día 07 de junio del 2023

## Jurado

Presidente:

Doctor José Luis Gómez Olivares

---

Secretario:

Doctor Rafael Valencia Quintana

---

Vocal 1:

Doctor Edmundo Bonilla González

---

Vocal 2:

Doctora Josefina Cortés Eslava

---

Vocal 3:

Doctor Eduardo Casas Hernández

---



Casa abierta al tiempo

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### Declaración de originalidad

La que suscribe Selene Karinna Trujillo Vázquez, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y autor(a) de la tesis o titulada: "La exposición crónica a baja concentración de plomo por tres generaciones: Efectos morfológicos y fisiológicos en gónadas de hembras de ratones CD1",

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctora es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 07 de junio del 2023.

Atentamente

Selene Karinna Trujillo Vázquez

*Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.*

#### DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



**UNIDAD CUAJIMALPA**  
Av. Vasco de Quiroga 4871  
Col. Santa Fe,  
Cuajimalpa de Morelos  
C.P. 05300, Cd. México

55 5814 6500 ext. 6534

**UNIDAD IZTAPALAPA**  
Av. Ferrocarril San Rafael  
Atlixco 186, Col. Leyes de  
Reforma 1a Sección, Iztapalapa  
C.P. 09310, Cd. México

55 5804 4600 ext. 3461

**UNIDAD LERMA**  
Av. De las Garzas 10  
Col. El Panteón,  
Lerma de Villada  
C.P. 52005, Edo. de México

72 8282 7002 ext. 2002

**UNIDAD XOCHIMILCO**  
Calz. del Hueso 1100,  
Col. Villa Quietud,  
Coyoacán  
C.P. 04960, Cd. México

55 5483 7000 ext. 7504

[doctoradocbs@correo.uam.mx](mailto:doctoradocbs@correo.uam.mx)

<http://posgradocbs.uam.mx>



Casa abierta al tiempo

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 07 de junio del año 2023, quien suscribe Selene Karinna Trujillo Vázquez, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autora intelectual de la tesis titulada “La exposición crónica a baja concentración de plomo por tres generaciones: Efectos morfológicos y fisiológicos en gónadas de hembras de ratones CD1”, bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por Dr. José Luis Gómez Olivares, Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana y de el De. Edmundo Bonilla González, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso de la autora o del Comité Tutoral del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico [nauyaca@outlook.com](mailto:nauyaca@outlook.com); si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Selene Karinna Trujillo Vázquez**  
**2183801981**



#### DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**UNIDAD CUAJIMALPA**  
Av. Vasco de Quiroga 4871  
Col. Santa Fe,  
Cuajimalpa de Morelos  
C.P. 05300, Cd. México

55 5814 6500 ext. 6534

[doctoradocbs@correo.uam.mx](mailto:doctoradocbs@correo.uam.mx)

**UNIDAD IZTAPALAPA**  
Av. Ferrocarril San Rafael  
Atlixco 186, Col. Leyes de  
Reforma 1a Sección, Iztapalapa  
C.P. 09310, Cd. México

55 5804 4600 ext. 3461

**UNIDAD LERMA**  
Av. De las Garzas 10  
Col. El Panteón,  
Lerma de Villada  
C.P. 52005, Edo. de México

72 8282 7002 ext. 2002

<http://posgradocbs.uam.mx>

**UNIDAD XOCHIMILCO**  
Calz. del Hueso 1100,  
Col. Villa Quietud,  
Coyoacán  
C.P. 04960, Cd. México

55 5483 7000 ext. 7504

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	6
ABSTRACT .....	7
I. INTRODUCCIÓN .....	8
II. MARCO TEÓRICO .....	9
El plomo (Pb) y sus usos.....	9
Regulación del Pb en México.....	10
Presencia de plomo y riesgos para la población.....	11
El ovario, el Pb y el estrés oxidante .....	12
El Pb e histología ovárica .....	15
Biomarcadores de estrés oxidante .....	17
JUSTIFICACIÓN .....	19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	19
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Diseño experimental.....	22
Preparación de muestras para análisis moleculares.....	23
Proteínas carboniladas.....	23
Lipoperoxidación.....	24
Glutati3n oxidado y reducido .....	23
Histología .....	25
Hormonas .....	25
Pruebas estadísticas.....	25
IV. RESULTADOS.....	26

i. Parámetros generales.....	26
ii. Marcadores de estrés oxidante .....	29
iii. Conteo folicular y características histológicas .....	32
V. DISCUSIÓN .....	39
VI. CONCLUSIONES.....	44
VII. PERSPECTIVAS.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Niveles permitidos de plomo de acuerdo con las NOMs .....	10
Tabla II. Proporción de hembras y machos en ratones hembra con distintos tratamientos .....	28
Figura 1. Etapas en la historia de vida basado en ratones C57BL/6J en comparación con seres humanos.....	21
Figura 2. Fases del ciclo estral identificados en ratonas CD1.....	21
Figura 3. Diseño experimental para los tratamientos administrados a las tres generaciones .....	22
Figura 4. Comparación del (a) peso y (b) ganancia de peso de F0, F1 y F2 con 20 semanas de tratamiento .....	26
Figura 5. Consumo promedio de (a) alimento y de (b) agua de F0, F1 y F2 .....	27
Figura 6. Comparación de la cantidad de (a) crías paridas y del (b) peso de crías paridas de F0 y F1 .....	28
Figura 7. Comparación de la proporción entre peso de ovarios con peso corporal de F0, F1 y F2.....	29
Figura 8. Coeficiente de relación de GSH/GSSG en homogenizado de ovario en hembras de F0, F1 y F2 .....	29
Figura 9. Proteínas carboniladas en homogenizado de ovario en hembras de F0, F1 y F2 .....	30
Figura 10. Niveles de TBARS en homogenizado de ovario en hembras de F0, F1 y F2 .....	31
Figura 11. Concentración de (a) hormona folículo estimulante y (b) hormona luteinizante en suero de hembras de F0, F1 y F2.....	32
Figura 12. Conteo de estructuras foliculares .....	33
Figura 13. Corte histológico de ovario derecho (OD) en hembras de F0 pertenecientes a los grupos C, A y P .....	36
Figura 14. Corte histológico de ovario derecho (OD) en hembras de F1 pertenecientes a los grupos C, A y P .....	37
Figura 15. Corte histológico de ovario derecho (OD) en hembras de F2 pertenecientes a los grupos C, A y P .....	38

## ABREVIATURAS

Pb	Plomo
PbA	Acetato de Plomo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EO	Estrés oxidante
AOX	Antioxidante
REDOX	Óxido-reducción
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
PC	Proteínas carboniladas

## RESUMEN

El plomo es un metal pesado persistente en el ambiente que sigue siendo relevante en la sociedad moderna, y cuyos efectos promueven el estrés oxidante en los organismos. Sin embargo, el impacto multigeneracional de la exposición a bajas concentraciones de plomo en el ovario no ha sido reportado. En el presente estudio se analiza la carbonilación de proteínas, la peroxidación de lípidos, el estado REDOX (proporción GSH/GSSG), la concentración de hormonas (FSH y LH) y la histoarquitectura en ovarios de ratones CD1 de manera unigeneracional (A, tratamiento de 75 días) y multigeneracional (P, 140 días de tratamiento) expuestas a 0.2 ppm de acetato de plomo, y los efectos fueron comparados con un grupo de control (testigo). Ninguna generación de los grupos experimentales mostró diferencias significativas entre la relación peso de los ovarios/peso corporal, el número de crías paridas o el peso de las crías destetadas en comparación con el grupo de control (testigo). El estado REDOX y la carbonilación de proteínas fueron significativamente más altos en todas las generaciones de ambos grupos experimentales, mientras que la peroxidación lipídica no difirió significativamente entre los grupos de la primera y la tercera generación. Los niveles de LH disminuyeron significativamente sólo en la primera generación de P, mientras que la FSH no varió entre los grupos de ninguna generación. Los grupos experimentales mostraron alteraciones histológicas en todas las generaciones como engrosamiento o pérdida de una estructura definida del epitelio germinal, vacuolación de las células que rodean los folículos, aumento de la vascularización y alteración de los componentes foliculares, con daño exacerbado en la segunda generación. Los hallazgos de este estudio muestran una alteración ovárica multigeneracional debido a la exposición a baja concentración de plomo, lo que plantea la pregunta



sobre las posibles implicaciones a largo plazo en la salud reproductiva de las mujeres expuestas crónicamente y de manera no ocupacional a este metal.

**Palabras clave:** Plomo, ovario, toxicidad, baja concentración, exposición, estrés oxidante.

## **ABSTRACT**

Lead is a persistent heavy metal in the environment that is still relevant in modern society, and whose toxic effects promote oxidative stress in the organisms. However, the multi-generational impact of low concentration lead exposure on the ovary has not been reported. We analyzed protein carbonylation, lipid peroxidation, redox state (GSH/GSSG ratio), hormone concentration (FSH and LH), and histoarchitecture in ovaries of CD1 mice in both unigenerational (A, 75-day treatment), and multigenerational (P, 140-day treatment) exposure to 0.2 ppm of lead acetate, and a control group. Neither generation of the experimental groups showed significant differences between the ovary weight/body weight ratio, number of pups delivered, or pups' weight after weaning compared to the control group. Redox state and protein carbonylation parameters were significantly higher in all generations of both experimental groups, while lipid peroxidation did not differ significantly amongst groups in the first and third generation. Levels of LH were significantly diminished only in the first generation of P, while FSH did not vary at all among groups of either generation. Experimental groups showed histological alterations in all generations like thickening or loss of a defined structure of the germinal epithelium, vacuolation of cells surrounding follicles, heightened vascularization, and alteration of follicular components, with exacerbated damage on the second generation. The findings in this study show a multigenerational ovarian alteration of low-level lead exposure, raising the question on the potential long-term implications on the reproductive health of females exposed in a non-occupational manner to this metal.

**Keywords:** Lead, ovary, toxicity, low concentration, exposure, oxidative stress.

## I. INTRODUCCIÓN

El plomo (Pb) es un metal pesado cuya presencia ha formado parte importante de la historia humana. Al identificarse procesos patológicos generados por la exposición a este metal, las agencias gubernamentales en diversos países se encargaron de normar su uso y niveles en el ambiente con la finalidad de proteger la salud de la población [Jooste y Anelich, 2008; Wu *et al.*, 2016]. Debido a su explotación histórica, persistencia ambiental, así como la influencia de la química del agua, el pH y la temperatura sobre la disponibilidad del Pb, este continúa representando una amenaza para la salud en distintas regiones del mundo donde ocurren exposiciones no ocupacionales [Ospina, 2015; Resongles *et al.*, 2021].

El Pb puede acceder al organismo por varias vías, la más común es gastrointestinal a través de la ingestión oral [Markowitz, 2000]. Una vez en el organismo, el Pb en forma iónica compite con metales esenciales (como el calcio), e interacciona con grupos sulfhidrilo y componentes proteicos íntimamente ligados al control en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) [Markowitz, 2000; Mah y Jalvilehvand, 2013]. Las ERO se encuentran en el organismo de manera natural, sin embargo, la exposición a Pb modifica la actividad de enzimas antioxidantes (AOX) y aumenta la cantidad de ERO en el organismo, provocando un desbalance en el sistema óxido-reducción (REDOX), generando el estrés oxidante (EO) [Patrick, 2006] y como consecuencia, daño en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, importantes para las funciones celulares [Wang *et al.*, 2012]; de esta manera, el Pb impacta negativamente al sistema reproductor al modificar componentes estructurales y bioquímicos relacionados a la salud reproductora de hembras de mamíferos [Wilson y Leigh, 1992].

La fertilidad femenina depende del ovario, el cual tiene un papel central en la maduración sexual a través de la producción hormonal, así como la generación y desarrollo de los ovocitos [Hoyer, 2014]; este puede responder rápidamente a la pérdida de homeostasis durante períodos cortos, pero el daño por exposición a tóxicos y al estrés oxidante de manera prolongada puede afectar la fertilidad a largo plazo. Debido a esto, resulta muy importante ahondar en los conocimientos sobre los mecanismos de toxicidad de este metal [Chang *et al.*, 2006; Hsiao-Ling *et al.*, 2015; Trujillo-Vázquez *et al.*, 2021].

El Pb compromete considerablemente la salud reproductiva a corto o largo plazo incluso en exposiciones a concentraciones traza de Pb gracias al EO que genera [Doumouchtsis *et al.*, 2009; Junaid *et al.*, 2010; Bloom *et al.*, 2011; Jomova y Valko, 2011; Sharma y Bhattacharya, 2014]. Debido a que el Pb es acumulado en hueso y puede ser liberado durante la gestación y la lactancia, tiene el potencial de

dañar la salud reproductora de las mujeres y su descendencia [Gulson *et al.*, 2003; Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2010; Winiarska-Mieczan y Kwiecien, 2016]. Para entender la magnitud del daño que una concentración menor a trabajos previos con este metal puede ejercer, así como la dependencia de dichas alteraciones en la continuidad del tratamiento sobre la descendencia femenina, el presente trabajo evaluó el efecto de una exposición crónica unigeneracional y multigeneracional a una baja concentración de plomo en hembras de ratón CD1, su relación con parámetros de estrés oxidante, niveles hormonales y modificaciones histológicas en ovarios.

## II. MARCO TEÓRICO

### El plomo (Pb) y sus usos

El Pb es un metal gris azulado que se encuentra en pequeñas cantidades en la corteza terrestre. Gran parte del Pb en el ambiente proviene de actividades humanas. Debido a esto, las agencias gubernamentales en diversos países se encargaron de normar los niveles de Pb en el ambiente [Jooste y Anelich, 2008; Wu *et al.*, 2016] con el propósito de minimizar los efectos nocivos sobre los seres humanos y animales. Por esta razón, el Pb de la gasolina, pinturas, calafateo y soldadura de tubería se redujo significativamente [Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR por sus siglas en inglés), 2017]. Pese a esto, continúa siendo un compuesto de importancia para la producción industrial en países en desarrollo [Ospina, 2015]. Los compuestos de Pb actualmente usados a nivel industrial son:

El tetraetilo y tetrametilo de plomo se emplearon en Estados Unidos como aditivos para aumentar el octanaje de la gasolina. Su uso se discontinuó gradualmente y se prohibió a partir del primero de enero de 1996, sin embargo, el tetraetilo de plomo aún se emplea en gasolina para aviones [ATSDR, 2017], así como en las baterías para automoción, protección contra radiaciones de todo tipo, vidrios especiales para aplicaciones técnicas o artísticas, protección de superficies contra la humedad, entre otros.

Las aplicaciones actuales del nitrato de plomo incluyen su uso como estabilizador de calor en nylon y poliésteres o como recubrimiento para papel fototérmico, plaguicidas y pigmentos o colorantes. El sulfato de plomo (o tetraoxosulfato de plomo) suele emplearse en pigmentos de pintura, como reactivo de laboratorio y en baterías de acumuladores. El acetato de plomo se usa como fijador para algunos tintes. En bajas concentraciones (de 1 %), es el principal ingrediente activo en una variada gama

de tinturas progresivas del cabello, también se utiliza como mordiente en impresión y tinte textil, así como desecante en pinturas y barnices, pinturas antiincrustantes e insecticidas. En los laboratorios de las industrias azucareras, se emplea para purificar muestras de jugo de cañas de azúcar, con fines analíticos [Ospina, 2015].

## Regulación del Pb en México

Las NOM-117-SSA1-1994 y NOM-199-SSA1-2000 son Normas Oficiales Mexicanas, establecidas para el monitoreo obligatorio en el territorio nacional por parte de los prestadores de servicios de salud y para los laboratorios que realicen pruebas para la determinación de plomo en sangre. Dicha Norma es aplicable como criterio de referencia en el desarrollo de programas de evaluación e investigación de los riesgos y daños a la salud de la población originados por la contaminación ambiental debida al plomo.

El límite permisible de plomo en agua para uso y consumo humano establecido en 1994 por la NOM-117-SSA1-1994 sufrió una disminución en el año 2000 (Tabla I). Ese mismo año se estableció la norma que se encarga de vigilar los niveles de plomo en sangre que podrían encontrarse en la población expuesta de manera no ocupacional, así como las acciones para proteger la salud de esta [NOM-199-SSA1-2000] (Tabla I). De acuerdo con la NOM 117-SSA1-1994 los niveles límite de Pb en agua potable deben reportarse en mg/L (1 mg/L= 1ppm), mientras que la NOM-199-SSA1-2000 indica que los niveles de plomo en sangre (NPS) deben reportarse en µg/dL (10 µg/dL=0.1 ppm).

Tabla I. Niveles permitidos de plomo de acuerdo con las NOMs

	Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. NOM-127-SSA1-1994	Niveles de Pb en sangre en población no expuesta ocupacionalmente NOM-199-SSA1-2000
Unidad	mg/L	µg/dL
Equivalencia	1mg/L=100 µg/dL	1 µg/dL= 0.01 mg/L
Límite permisible	1-2.5 µg/dL	10-24 µg/dL
Límite mínimo de acción	(0.01-0.025 mg/L)	(0.10-0.14 mg/L)

De acuerdo con la NOM-199-SSA1-2000, se considera que a partir de 10 µg/dL (0.1 ppm) de Pb en sangre, existe un riesgo potencial a la salud de niños y embarazadas en la población no expuesta ocupacionalmente. Se ha sugerido que el adulto absorbe un 10% del Pb consumido y los niños un 50% [Markowitz, 2000]. Por esta razón se considera que la población expuesta a concentraciones que sobrepasen el nivel más bajo aceptable de Pb en agua de acuerdo con la NOM-127-SSA1-1994,

presentarán niveles de Pb que la NOM-199-SSA1-2000 podría considerar como de posible riesgo. De ser así, se recomienda realizar un monitoreo médico recurrente durante 3 meses para descartar potenciales fuentes de exposición, identificar si existe un aumento de dichas concentraciones y, de ser necesario, aplicar un plan de acción adecuado para la protección a la salud.

### **Presencia de plomo y riesgos para la población**

La persistencia ambiental del Pb lo convierte en un metal de importancia pese a la regulación implementada desde la década de los 90s. Aunado a esto, la existencia de Pb en combustibles para aviones [ATSDR, 2017; Ospina, 2015], pinturas, sistemas de distribución de agua, baterías, cosméticos [Biasioli *et al.*, 2006; Bindler, 2011; Ospina, 2015; Luo *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016], el uso de agua contaminada para irrigar cultivos [Fitamo *et al.*, 2007], los fallos en el tratamiento de agua potable [Maloney *et al.*, 2018], el uso de "trampas" en los tests que encubren niveles peligrosos de Pb en agua [Roy y Edwards, 2019], los desastres mineros [Taggart *et al.*, 2006; Haro *et al.*, 2013], su presencia como sustancia secundaria derivada de la minería [Doadrio-Villarejo, 2006], así como la generación de desechos de industrias que lo emplean como materia prima [Schell *et al.*, 2010], contribuyen a que el Pb continúe siendo una amenaza a la salud en la población general.

El Instituto de Sanimetría y Evaluación en Estados Unidos (IHME por sus siglas en inglés) [2019] reportó a nivel global que 1 de cada 3 niños, hasta aproximadamente 800 millones, tienen niveles de Pb en sangre superiores a 5 µg/dL (0.05 ppm). La exposición a este metal provocó 0.9 millones de muertes, la pérdida de 21.7 millones de años de vida saludable y el 62.3% de la discapacidad intelectual del desarrollo idiopático en todo el mundo, principalmente en países de bajos y medianos ingresos [IHME, 2019] donde se observa una mayor frecuencia de exposición a concentraciones ambientales superiores a los límites máximos establecidos por agencias gubernamentales de manera no ocupacional [Liu *et al.*, 2017; Pelfrene y Douay, 2017; Nazarpour *et al.*, 2019; Aguilera *et al.*, 2019], siendo la ingestión directa de compuestos contaminados con Pb, la principal vía de intoxicación [Fuentes-Gandara *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Tamayo y Ortiz *et al.*, 2016; Jarvis *et al.*, 2018; Ngole-Jeme *et al.*, 2018; Oben-Gyasi, 2019].

Los niveles de Pb observados varían en cada país [Iqbal, 2012; Caravanos *et al.*, 2014; Hobi, 2014], provocando daños que comprometerán la salud reproductiva a largo plazo de las mujeres de estas poblaciones [Chang *et al.*, 2006; Hsiao-Ling *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019]. En México, como en otros países, la prevalencia de poblados cerca de zonas mineras [Morales *et al.*, 2015] y de desechos tóxicos

[Caravanos *et al.*, 2016] es una de las razones más importantes por las que parte de la población entra en contacto con Pb. Sin embargo, la exposición por el uso de tuberías y pinturas a base de Pb en casas antiguas, en jardines de niños [Ayowale, 2014; Rocha-Silva *et al.*, 2018], en alfarería [Díaz-Ruiz *et al.*, 2017], en dulces, así como su presencia como partículas en suspensión en áreas urbanas, representan un peligro constante para la población en general [Salcedo *et al.*, 2016; Tamayo y Ortiz *et al.*, 2016; Resongles *et al.*, 2021].

### **El ovario, el Pb y el estrés oxidante**

El ovario es vital en la reproducción debido a que el desarrollo, maduración y ovulación de gametos ocurre dentro de los folículos ováricos [Panwar *et al.*, 2011], donde la producción de células germinales viables y la señalización de hormonas sexuales son clave para mantener una salud reproductiva óptima. La interacción entre las células de la granulosa y el ovocito mantiene la viabilidad de éste, mientras que la interacción entre las células de la granulosa y de la teca resulta en la producción hormonal, por lo tanto, cualquier agente que ponga en riesgo la salud folicular, afectará directamente la fertilidad [Hirshfield, 1991; Nampoothiri y Gupta, 2005; Nampoothiri *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2020]. Dentro de estos procesos, la hormona estimuladora del folículo (FSH por sus siglas en inglés) controla el crecimiento de las células de la granulosa, así como la producción de estradiol, mientras que la hormona luteinizante (LH por sus siglas en inglés) controla la ovulación y la luteinización folicular, ambas son producidas en el hipotálamo y son importantes en los procesos de maduración folicular [Richards y Pangas, 2010].

La forma más inmadura del folículo se denomina “primordial”. Es un ovocito rodeado por una monocapa de células de la granulosa con morfología escamosa. Una vez activado, este folículo madura para volverse un folículo primario, donde el ovocito es rodeado por una monocapa de células de la granulosa cuboidales [Hoyer, 2014]. El folículo madura y se convierte en folículo secundario, en el cual las células de la granulosa proliferan para formar una capa multicelular que rodea al ovocito, obteniendo a la vez una capa de células de la teca interna; las células de la granulosa y de la teca interactúan para producir  $17\beta$ -estradiol (el principal estrógeno asociado a la función ovárica). Conforme avanza el desarrollo folicular, comienza a formarse una cavidad llena de fluido (el antro). El folículo más grande es denominado folículo antral o preovulatorio. Aquellos folículos que no ovulan mueren en un proceso conocido como atresia (degeneración, apoptosis y reabsorción) [Hoyer, 2014].

Posterior a la ovulación, el ovocito es liberado y entra al oviducto, rodeado por varias capas de células de la granulosa. Las células residuales de la granulosa y de la teca en el ovario, son infiltradas y comienzan a luteinizarse, formando un cuerpo lúteo maduro, el cual producirá progesterona (importante para el proceso de implantación). Al final del ciclo ovárico, si el organismo no ha quedado embarazado, el cuerpo lúteo sufre una regresión [Hoyer, 2014]. Se ha observado que, si los folículos maduros o antrales son mermados, ocurrirá una interrupción temporal en las funciones reproductoras, ya que estos folículos pueden ser reemplazados por aquellos que provengan de la reserva ovárica, sin embargo, la destrucción de los folículos primordiales y primarios conlleva a la infertilidad permanente, así como la falla ovárica prematura, debido a que la reserva ovárica es irremplazable [Hoyer y Keating, 2014].

Las ERO son moléculas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada, se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y juegan un papel importante en la señalización celular [Betteridge, 2000; Reczek y Chandel, 2015]. En el ovario, la producción de ERO es un fenómeno normal durante la esteroidogénesis, la maduración folicular, la reanudación de la meiosis y la ovulación [Sugino, 2005], además, las ERO juegan un papel importante en la fisiología del eje hipotálamo-pituitario-gonadal. Sin embargo, un desbalance REDOX tiene la capacidad de provocar distintos efectos en la fisiología ovárica.

Algunos ejemplos incluyen la rápida inhibición de la síntesis hormonal en las células lúteas y de la granulosa tanto en ratas como en humanos ocasionada por un incremento en los niveles de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  [Behrman y Preston, 1989; Margolin *et al.*, 1990; Endo *et al.*, 1993; Behrman *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2016; Masudul-Hoque *et al.*, 2021]; el daño al DNA en las células lúteas e inhibición de la síntesis de proteínas inducido por el radical  $OH\bullet$  interrumpe el desarrollo folicular y la ovulación [Behrman y Preston, 1989; Musicki *et al.*, 1994; Agarwal *et al.*, 2016]. Aunado a esto, la inactivación de proteínas responsables de reparar daños al DNA ocasionados por las ERO, disminuye el número de óvulos disponibles y, si bien es posible un embarazo, el daño al material genético compromete la estabilidad de los cromosomas heredados [Titus *et al.*, 2013].

La generación de las ERO es contrarrestada por enzimas como la superóxido-dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión-peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), la molécula de glutatión (GSH), entre otras, cuyo equilibrio es crucial en la salud reproductiva. De acuerdo con la ATSDR [2017], la exposición a concentraciones superiores a los valores diarios tolerables o aceptables establecidos (ADI-

Acceptable dietary intake por sus siglas en inglés) de metales tóxicos, puede afectar la salud reproductiva de las mujeres debido a la alteración en la actividad y disponibilidad de las enzimas antioxidantes (AOX).

Dentro de las múltiples modificaciones provocadas por el Pb se encuentra la inhibición de proteínas y moléculas AOX, lo que provoca el aumento de ERO como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el radical hidroxilo (OH•), alterando el balance óxido-reducción (REDOX) [Ahamed y Siddiqui, 2007]. Debido a este desbalance, la regulación de la reproducción femenina en distintas edades es comprometida debido a la alteración de los procesos de maduración folicular y señalización hormonal [Dennerly, 2004; Patrick, 2006; Ahamed y Siddiqui, 2007].

Un ejemplo relacionado a Pb se encuentra en el trabajo de Aglan *et al.* [2020] con células de la granulosa bovinas; donde observaron disminución significativa de dos proteínas involucradas en la regulación del estado REDOX: Nrf2 (factor de transcripción regulador de la respuesta antioxidante) y NFκβ (participa en la supervivencia celular) durante la exposición a Pb, independientemente de la concentración empleada en los cultivos, una correlación directa de la concentración con la muerte celular, así como con la inhibición de las enzimas AOX como SOD, GPx, CAT, GR y de la molécula de glutatión (similar al trabajo de Ma *et al.*, 2020), afectando la salud ovocitaria. Por otro lado, Sharma *et al.* [2012 b] evaluaron el efecto protector de las vitaminas C y E en ratones hembra expuestas a PbA (acetato de plomo); observaron que el tratamiento con vitamina E ejerce una mayor protección ante el daño oxidante en los ovarios, sin embargo, el Pb afectó los folículos en desarrollo y maduros, por lo cual concluyen que el incremento de las ERO inducido por el Pb es responsable de la disfunción ovárica que afectará a la reproducción.

Vermande-Van Eck y colaboradores [1960], reportaron en monos Rhesus que el Pb causó, una marcada inhibición del crecimiento folicular, daño en ovocitos primordiales, así como fallos en la ovulación. Taupeau y colaboradores [2001], observaron que bajos niveles de Pb en sangre no modifican el peso ovárico, pero puede acumularse en el ovario, disminuye la cantidad de folículos primordiales, incrementa el número de folículos atrésicos, así como la separación de células de la granulosa, y el reinicio de la meiosis en ratones. Si bien la intoxicación por el Pb no causa esterilidad total, compromete la fertilidad femenina al mermar la foliculogénesis, así como el desarrollo de células germinales durante la organogénesis en la vida fetal [Taupeau *et al.*, 2001; Lefevre, 2001; Fortune, 2003; Shah *et al.*, 2008]. Aunado a esto, cultivos celulares de aves [Ma *et al.*, 2020] y crías de ratas expuestas *in utero* al Pb han mostrado dispersión de las células foliculares, destrucción del parénquima ovárico y reducción en la



cantidad de folículos en crecimiento [Shirota *et al.*, 2003; Dumitrescu *et al.*, 2009]. Si bien altas concentraciones de Pb pueden ocasionar un daño notable en tejidos, también pueden observarse efectos deletéreos a bajas concentraciones, los cuales podrían magnificarse conforme aumenta el tiempo de exposición, provocando daño celular irreversible [Ma *et al.*, 2020].

Bruno-Nascimento *et al.* (2016), elucidaron que la distribución del Pb en hembras gestantes no se limita sólo a los órganos ya conocidos, sino también a la leche materna, y que, en las crías de dichas hembras, las concentraciones de Pb aumentan en hueso y ovarios debido a la exposición desde el útero y durante la lactancia, provocando infertilidad [Bruno-Nascimento *et al.*, 2016; Dursun *et al.*, 2016]. Aunado a esto, se ha encontrado que las concentraciones de Pb en tejido ovárico son hasta ocho veces mayores en tejidos de tumores malignos y limítrofes en comparación con los de ovarios saludables, donde provoca el aumento de radicales libres que dañan directamente al DNA, y promueve el desarrollo de procesos cancerígenos [Rabanni-Chadegani *et al.*, 2009; Jomova y Valko, 2011; Gadhia *et al.*, 2012; Canaz *et al.*, 2017]. Lo anterior invariablemente compromete la salud reproductiva, por lo que la citotoxicidad, la inhibición enzimática y el estrés oxidante por la exposición al Pb no son efectos excluyentes entre sí, sino distintos resultados de las alteraciones inducidas por el metal.

### **El Pb e histología ovárica**

Las características histológicas del ovario saludable son resultado del balance de distintos procesos metabólicos que mantienen las funciones y estructuras celulares en óptimas condiciones. Durante la etapa reproductiva, los ovarios presentan cambios estructurales y funcionales de manera cíclica, como el crecimiento y la maduración folicular, la ovulación, la formación y la degeneración del cuerpo lúteo. Por esta razón, el mantenimiento adecuado de las estructuras involucradas en estos procesos influirá directamente en la capacidad reproductora femenina [Sharma *et al.* 2012a].

El Pb causa alteraciones tanto en la fisiología, como en las estructuras gonadales femeninas [Qureshi y Sharma, 2012], debido a que las ERO son aumentadas durante la exposición a Pb, estas tienen la capacidad de alterar los componentes histológicos al modificar proteínas involucradas en el mantenimiento de las estructuras celulares [Agarwal *et al.*, 2016]. Por otro lado, a nivel fisiológico, la alteración del eje hipotálamo-hipofisiario, de la síntesis esteroidea en las células de la granulosa, junto a la modificación de componentes celulares por el aumento en la cantidad de radicales libres y el

consecuente estrés oxidante, afectan el crecimiento y la maduración de los óvulos [Dumitrescu *et al.*, 2015; Agarwal *et al.*, 2016; Balasch y Fabregues, 2006].

La concentración corporal de Pb suele relacionarse directamente con el nivel de exposición, donde algunos de los cambios reportados son edemas difusos, necrosis y reducción en el tamaño de los folículos [Dumitrescu *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2008]. Pese a que la cantidad de folículos no sea disminuida, puede haber ovocitos degradados o con zona pelúcida no visible y apoptosis masiva [Jasim-Sodani, 2017]. Los daños en los componentes celulares generan la muerte del óvulo, provocando una infertilidad inmediata (Hoyer, 2014).

Se ha observado que individuos expuestos a bajas dosis también pueden presentar una reducción significativa en la cantidad de folículos, tanto primarios como secundarios, así como atresia folicular en todas las etapas de desarrollo [Junaid *et al.*, 2010]. Sin embargo, existe controversia al intentar esclarecer si la reducción en la cantidad de folículos es resultado del daño en la reserva de los folículos primarios o del efecto directo sobre los folículos secundarios y terciarios en ratas expuestas crónicamente [Sharma *et al.*, 2012b; Dhir y Dhand, 2010].

Dentro de los efectos multigeneracionales, se ha reportado que la administración de Pb a ratones hembra durante la gestación redujo la cantidad de folículos primordiales y en desarrollo, alteró la estructura ovárica, aumentó la cantidad de folículos atrésicos o destruidos, indujo alteración en las células de la granulosa y modificó la estructura folicular tanto en gestantes como en crías posterior al destete [Panwar *et al.*, 2011], dicho daños fueron exacerbados en función del tiempo de exposición, en concordancia con los trabajos de Taupeau *et al.* [2001], Panwar *et al.* [2011] y Sharma *et al.* [2012a].

Debido a que el Pb puede traspasar la barrera placentaria y afectar al tejido fetal, dichos autores infieren que la exposición en etapas de vida temprana *in* útero y durante la lactancia, modifica precursores básicos gonadales, causando una drástica reducción de la fertilidad durante la edad adulta. Estos hallazgos concuerdan con el trabajo de Sharma y Bhattacharya [2014], donde además observaron una reducción en el diámetro de folículos en la fase de crecimiento, así como un incremento de los folículos antrales atrésicos y deformación del ovario de hembras que consumieron leche materna contaminada, con daño progresivo conforme avanzaban los días de exposición.

Bires *et al.* [1995], previamente observaron estos efectos en recién nacidos, aunado a una reducción en el número de células germinales en las gónadas en desarrollo de ovejas expuestas al PbA. Al respecto, Taupeau *et al.* [2001] y Qureshi, *et al.* [2010], plantean que estas alteraciones no se deben

sólo a la exposición incidental, sino que el Pb acumulado en el ovario podría provocar una disfunción de la foliculogénesis.

El nivel y duración de la exposición a un tóxico ambiental influye en la magnitud del impacto en la reproducción. En exposiciones a bajas concentraciones donde el daño es principalmente a folículos primarios esto podría no parecer de mayor preocupación, hasta que ocurran procesos patológicos años después [Hoyer, 2014]. Por lo que hembras expuestas a bajas concentraciones de manera ocupacional o incidental tienen una gran probabilidad de sufrir daño en ovarios, afectando la salud reproductiva a largo plazo [Chang *et al.*, 2006; Doumouchtsis *et al.*, 2009; Junaid, *et al.*, 2010; Sharma y Bhattacharya, 2014; Hsiao-Ling *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2020].

La exposición al Pb en individuos gestantes es extremadamente peligrosa, conforme el Pb pasa a través de la placenta durante la gestación y a través de la leche durante la lactancia, no sólo afecta la fertilidad en hembras gestantes, sino que también altera el desarrollo en las gónadas en las crías de madres expuestas, causando fertilidad reducida durante la adultez de la descendencia [Valdivia-Infantas, 2005; Sharma *et al.*, 2012a].

Los efectos del Pb sobre el ovario anteriormente citados son de gran relevancia en temas de salud pública, ya que se ha comprobado que los niveles de este son significativamente mayores en mujeres con tumores ováricos malignos, síndrome de ovario poliquístico (SOP) e infertilidad [ATSDR, 2017; Cerna *et al.*, 2012; Hsiao-Ling *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Canaz *et al.*, 2017] y, aún al encontrarse por debajo de los valores de referencia necesarios para considerarse un riesgo para la salud humana, las afecciones en la fisiología e histología ovárica pueden ser a largo plazo [ATSDR, 2017].

### **Biomarcadores de estrés oxidante**

Los marcadores biológicos o biomarcadores son cambios medibles (bioquímicos, fisiológicos o morfológicos) utilizados para detectar condiciones específicas de un individuo como la exposición a un xenobiótico, determinando las consecuencias biológicas a nivel molecular o sistémico, e identificando procesos patológicos [Peakall, 1994]. Dentro de las distintas técnicas para monitorear la salud de un organismo, se encuentra la medición de parámetros asociados al EO [Roche y Romero-Alvira, 1997].

Entre los más confiables se encuentran la determinación de las proteínas carboniladas (PC), el cual se considera un marcador estable de estrés oxidante [Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006].

Las PC surgen cuando los radicales libres rompen y oxidan la cadena polipeptídica principal u oxidan las cadenas laterales de las proteínas, provocando daño a tejidos [Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2016].

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS): Una parte muy importante de las reacciones de radicales libres oxidantes involucran a los ácidos grasos insaturados constituyentes de las membranas biológicas a través del proceso de lipoperoxidación [Boveri, 1999] donde aumentan productos como el malondialdehído. En ausencia de AOX, provoca la rápida destrucción de la estructura lipídica de las membranas, inactivando receptores o enzimas unidas a las membranas [Quintanar-Escorza *et al.*, 2010].

La proporción GSH/GSSG: El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido que contiene un grupo tiol libre, siendo el principal antioxidante en tejidos que provee de reductores equivalentes para enzimas como la glutatión-peroxidasa, catalizando la reducción de hidroperóxidos lipídicos. Durante estas reacciones la formación de enlaces disulfuro entre dos moléculas de GSH da origen al glutatión oxidado (GSSG), el cual es reducido a GSH de manera simultánea. Cuando las células sufren estrés oxidante GSSG se acumulará y el rango de GSH a GSSG disminuirá, por lo tanto, es un indicador útil de estrés oxidante en células y tejidos.

El monitoreo de la actividad hormonal es relevante en los procesos de maduración sexual, reproducción y homeostasis. Una regulación hormonal comprometida por estrés oxidante se traducirá en una capacidad reproductora alterada. Las hormonas analizadas en el presente estudio son: La hormona luteinizante (LH), que juega un papel clave en las funciones gonadales, al actuar de forma sinérgica con la hormona folículo estimulante (FSH) estimulando el crecimiento, maduración folicular y la ovulación, siendo la acción complementaria de ambas hormonas importante para el crecimiento normal de un folículo, por lo que la inhibición de su actividad afectará en gran medida la capacidad de una hembra de preñarse [Kierszenbaum, 2007].

## **Ratones CD1**

El stock de ratones CD1 es de origen exogámico, lo cual le confiere variabilidad genética, representando con mayor exactitud los efectos que se observarían en una población humana. Es empleado como modelo por su facilidad de manejo y eficacia para realizar pruebas oncológicas, toxicológicas y teratogénicas, entre otras [Benavides y Guénet, 2003]. Son de carácter dócil con un promedio de 12 crías por hembra.

## JUSTIFICACIÓN

Si bien el conocimiento general sobre el efecto del Pb en organismos es extenso, los estudios enfocados en hembras son menos comunes que en machos, aún menos de manera generacional. A pesar de que la modificación a la NOM-199-SSA1-2000 maneja límite mínimo permisible de Pb en sangre de población no expuesta ocupacionalmente de 0.1 ppm (10 µg/dL), durante muchos años el límite fue de 0.25 ppm (25 µg/dL). Aunado a esto, las acciones de tratamiento y control se han enfocado en los potenciales efectos neurotóxicos. Los aspectos relacionados a la salud reproductiva a nivel de gónadas femeninas no han sido abordados. Además, la escasez de estudios que evalúen el impacto del estrés oxidante en una exposición crónica a baja concentración de Pb deja un gran vacío en la información respecto al perjuicio que puede provocar en órganos reproductores de hembras.

El Pb es un metal cuyo mecanismo de daño principal se dirige a través del estrés oxidante, debido principalmente a su interacción con los grupos sulfhidrilo disponibles en las biomoléculas, inhibiendo o modificando la actividad de distintos componentes celulares. Anteriormente se han realizado trabajos en ratones expuestos a Pb, sin embargo, éstos han sido de manera aguda a altas concentraciones para estudiar efectos en espermatogénesis o anomalías histológicas en una sola generación de organismos. El presente estudio pretende evaluar el efecto de la exposición crónica de tres generaciones a baja concentración de Pb sobre biomarcadores de estrés oxidante y características histológicas en gónadas de hembras de ratones CD1, para determinar si dicha concentración provocará afecciones y si estas serán observables en distintas generaciones.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La exposición crónica a una baja concentración de plomo provocará daños a nivel fisiológico y morfológico en gónadas femeninas de tres generaciones de ratones CD1?

## HIPÓTESIS

Si el plomo es capaz de provocar un desbalance en el estado REDOX celular y este metal puede ser transferido por vía materna, entonces la exposición crónica a baja concentración modificará parámetros indicadores de estrés oxidante en ovarios de tres generaciones de hembras de ratones CD1.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si la exposición crónica a una baja concentración de Pb provocará modificaciones en marcadores de estrés oxidante y daños tisulares en gónadas femeninas en tres generaciones de hembras de ratones CD1.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si la exposición crónica a una baja concentración modifica marcadores de estrés oxidante en gónadas de hembras en tres generaciones.
- Establecer si la exposición crónica a una baja concentración afecta parámetros hormonales en suero de hembras de tres generaciones.
- Identificar si la exposición crónica a una baja concentración genera alteraciones histológicas en gónadas de hembras y si esto se reflejará en las tres generaciones.

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procesos de manutención y experimentación se siguieron de acuerdo con las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 y al reglamento del Bioterio UAM-I. El método para la exposición de ratones CD1 a acetato de plomo (PbA | Sigma-Aldrich) fue estandarizado por el Laboratorio de Biomembranas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, a través del agua para beber. Todos los grupos se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad, en ambientes cerrados de 35 x 40 cm aproximadamente con una cama de aserrín, teniendo agua y comida disponible a todas horas. Se utilizó una concentración 0.2 ppm en agua para beber con base a las estimaciones de Markowitz [2000], de modo que la concentración final en sangre no rebasó el límite establecido en la NOM-199-SA-2000.

Se establecieron 3 grupos experimentales, el grupo control o testigo (C) bebió agua purificada en bebederos con capacidad de 250 ml. El grupo experimental, dividido a su vez en grupo P (exposición crónica en las 3 generaciones) y grupo A (sólo F0 expuesta hasta antes de la preñez, F1 y F2 sin tratamiento), preparando el agua para beber con acetato de plomo diluido a una concentración de 0.2 ppm (por encima del límite permisible establecido en la modificación realizada en el 2000 a la NOM-127-SSA1-1994) en bebederos con capacidad de 250 ml. Todos los grupos fueron alimentados con

pellets balanceados (Purina Rodent Lab Chow 5001). Ambos tratamientos se mantuvieron hasta el sacrificio de las hembras mientras se encontraban en la edad de madurez sexual a los 140 días de edad (Figura 1). Hubo un total de 5 individuos por ambiente para evitar estrés por aglomeración, dejando un lapso de 7 días para aclimatación al medio.

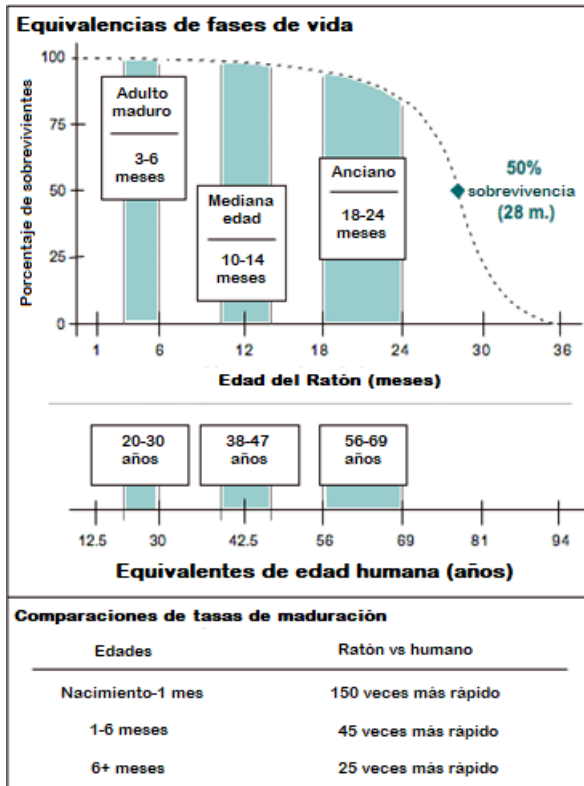


Figura 1. Etapas en la historia de vida basado en ratones C57BL/6J en comparación con seres humanos para determinar la edad adecuada para la cruce y sacrificio de las hembras. Datos adaptados por Hagan (2017). The Jackson Laboratory.

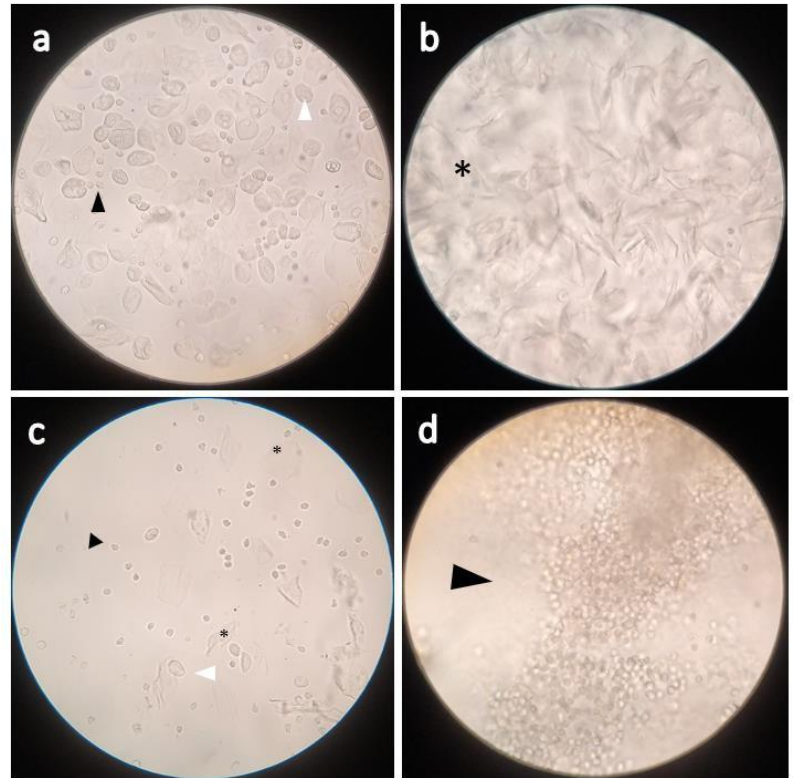


Figura 2. Fases del ciclo estral identificadas en ratonas CD1. [a] Proestro, [b] Estro, [c] Metaestro y [d] Diestro. Si bien un tipo celular dominará el campo, pueden encontrarse otros tipos celulares dependiendo si es etapa temprana o tardía de la fase del ciclo estral. Las células que permiten identificar cada fase son los leucocitos [flecha negra], células nucleadas [flecha blanca] y células cornificadas [\*].

Las hembras de todas las generaciones se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital, tomando muestras de sangre por punción cardiaca, así como del seno venoso orbital, obteniendo 20-600  $\mu$ l de suero por individuo para análisis de actividad hormonal. Se realizó la disección y pesado de los ovarios. El ovario derecho (OD) de 4 hembras por grupo se empleó para análisis histológico, mientras que el ovario izquierdo (OI) para el índice de GSH/GSSG. La medición de marcadores moleculares de estrés oxidante se realizó homogenizando ambos ovarios de 4 hembras por marcador, los cuales fueron alicuotados y procesados de acuerdo con las distintas técnicas establecidas (Hernández-Álvarez *et al.*, 2019; Mesquita *et al.*, 2014; Jentsch *et al.*, 1996).

Se realizó un seguimiento del ciclo estral debido a que los procesos fisiológicos normales asociados a la ovulación dependen de la fase del ciclo en que se encuentren, siendo el proestro, estro y metaestro aquellas fases donde se aumentan de manera natural los niveles de ERO en el ovario, debido a que son procesos relacionados con la ovulación. Por esta razón, consideramos el diestro como la fase del ciclo estral adecuada para realizar los sacrificios y mediciones de los marcadores de estrés oxidante. La técnica de frotis vaginal fungió como herramienta útil para determinar la fase del ciclo estral adecuada para cruzar y sacrificar a las hembras [Byers *et al.*, 2012]. Si bien en un principio se planteó el uso de la determinación de la fase del ciclo estral por observación de genitales externos, se comprobó que la citología vaginal es la técnica más confiable para determinar las fases de manera precisa (Figura 2).

### Diseño experimental

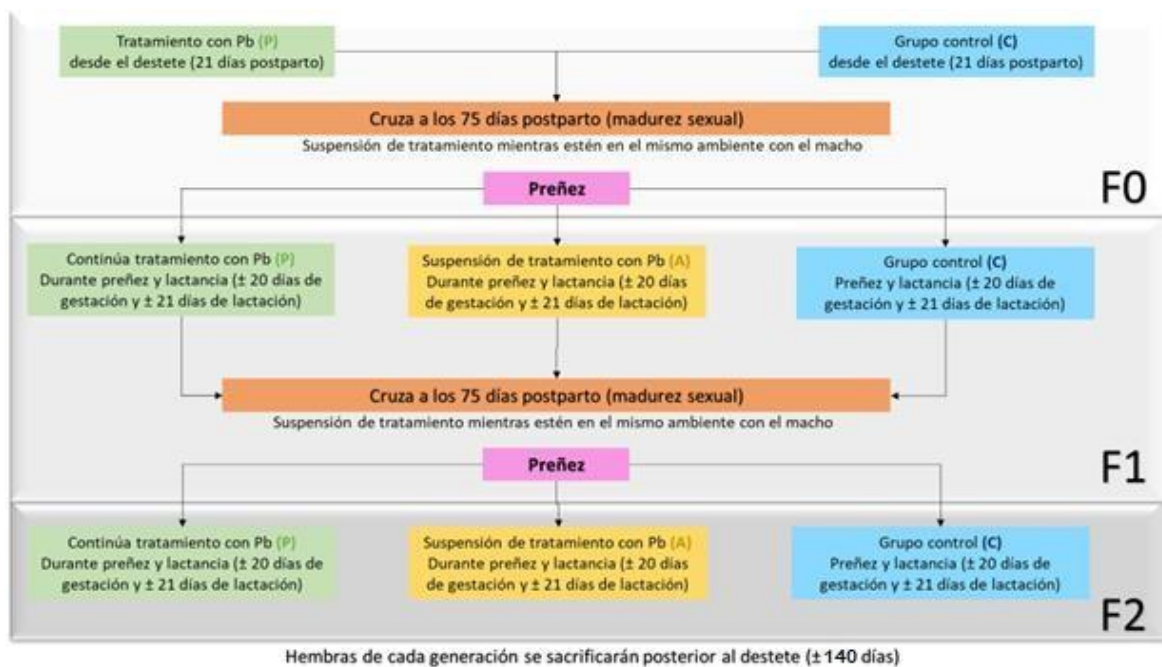


Figura 3. Diseño experimental para los tratamientos administrados a las tres generaciones. Tratamientos para F0: P-tratamiento desde destete hasta destetar a sus propias crías; A-tratamiento hasta cruza, suspensión de tratamiento desde preñez. Tratamiento para F1: P-Tratamiento con plomo desde gestación hasta destete de sus propias crías; A-Sin tratamiento con plomo. Tratamiento para F2: P-Tratamiento con plomo desde gestación hasta destete; A- Sin tratamiento con plomo en ningún momento.

En la primera generación, se usaron 6 hembras tratadas crónicamente con Pb (P), 6 tratadas con Pb hasta antes de la preñez (A) y 6 del grupo testigo (C). Las hembras de la primera generación (F0) fueron expuestas desde el destete (21 días de edad) hasta la madurez sexual (2 y medio meses de edad) a 0.2 ppm (20  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) de PbA a través del agua para beber. Una vez cumplido ese período, se colocaron



en el mismo ambiente con un macho experto saludable, suspendiendo temporalmente el tratamiento con PbA para evitar la exposición de los machos. Una vez identificado el tapón vaginal, se separó al macho, colocando máximo 3 hembras en ambientes separados para evitar errores debido a comportamientos que pudiesen afectar la interpretación de los datos (ej. abortos, canibalismo, competencia por alimento y comida, depresión por aislamiento). Las hembras del grupo experimental de F0 se dividieron en los grupos señalados anteriormente. Una vez destetadas las crías que conformaron la 2ª Generación (F1), se separaron las hembras de cada grupo: continuando el tratamiento en el grupo P y administrando agua al grupo A. Una vez destetadas las crías de la 3ª generación (F2), se mantuvieron las mismas condiciones hasta que las crías alcanzaran la misma edad que las madres al momento de ser sacrificadas. Todas las hembras fueron sacrificadas a los 140 días de edad (4 ½ meses de edad) (Figura 2).

### **Preparación de muestras para análisis moleculares**

Debido a que el peso de los ovarios varió en el grupo tratado (de 5 a 23 mg), se optó por usar ambos ovarios de cada ratón para TBARS y para PC, dejando por lo menos 3 hembras en las cuales se utilizó el ovario derecho para histología convencional, y el izquierdo para el índice GSH/GSSG. El suero se extrajo para la medición de hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Los ovarios se mantuvieron a -80°C para evitar degradación; posteriormente fueron homogeneizados y procesados de acuerdo con los lineamientos establecidos por cada kit y protocolo empleado [Mesquita *et al.*, 2014; Jentsch *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2019; Prophet y Mills, 1995].

### **Glutati6n oxidado y reducido**

El contenido de glutati6n reducido (GSH) y glutati6n oxidado (GSSG) en ovarios fue determinado por cromatografía líquida de alta resoluci6n (HPLC) de acuerdo con el protocolo descrito por Hernández-Álvarez *et al.* [2019] con algunas modificaciones. Primero, se homogenizaron 200 mg de tejido ovárico con 800 µL de buffer de lisis (10% ácido tricloroacético/ 1mN disulfonato de batofenantrolina (BPDS por sus siglas en inglés)), centrifugándolo a 5000×g por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, inyectando 50 µL de la muestra en el sistema HPLC. El análisis se realizó usando una bomba binaria Waters 1525 HPLC (Waters, Miami, FL, USA) acoplada a un detector de absorbancia de longitud de onda dual 2489 UV/visible (Waters™) calibrado a 210 nm. Las curvas de calibraci6n se prepararon usando

estándares de GSH y GSSG (5, 10, 25, 50, 100, 200, y 400  $\mu$ M). Los resultados se reportaron en nM/ $\mu$ g de proteína.

### **Proteínas carboniladas**

Para determinar la presencia de las proteínas carboniladas en el plasma y ovario, se utilizó el método colorimétrico modificado de Mesquita *et al.* [2014]. En este proceso, son agregados 400  $\mu$ L de tejido homogenizado a 400  $\mu$ L de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM in 0.5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, son agregados 200  $\mu$ L de hidróxido de sodio (NaOH) 6 M, mezclando la muestra e incubando por 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadieron 250  $\mu$ L de ácido tricloroacético (50% w/v), seguido de su mezcla en el Vortex. La mezcla fue entonces incubada a 20 °C por 15 minutos y centrifugando a 23,640 g por 5 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue descartado sin alterar el pellet formado, dicho pellet fue lavado tres veces con 1 mL de etanol/acetato de etilo (1/1; v/v) para remover el DNPH libre. En cada paso del lavado, el pellet se mantuvo durante 10 minutos con el solvente de lavado, centrifugando a 23,640xg por 5 minutos antes del siguiente lavado. El pellet resultante fue resuspendido en 1.0 mL de 6 M guanidín-HCl. Un volumen igual de solución buffer fue usada como blanco. La absorbancia de la solución resultante fue leída a 450 nm posterior a la incubación por 10 minutos en una placa fotométrica Multiskan™ (Thermo Fisher).

### **Lipoperoxidación**

La medición de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se realizó en alícuotas de tejido ovárico homogenizado (0.1 M PBS, pH 7.5) utilizando la técnica espectrofotométrica de Jentsch y colaboradores [1996]. En dicho método es añadido 10% de ácido tricloroacético a cada muestra homogenizada; las mezclas se mantuvieron en hielo y fueron centrifugadas a 23,314g a 4 °C por 15 min. Posteriormente, el TBA es añadido al sobrenadante, agitando vigorosamente la muestra e incubando a 100 °C por 60 min. Después de este proceso, las muestras son enfriadas a temperatura ambiente, mezcladas de nuevo y centrifugadas, seguido de una lectura de absorbancia a 535 nm in un espectrofotómetro Multiskan™ (Thermo Fisher). Los resultados se reportaron en mM/ $\mu$ g de proteína.

## **Histología**

Los ovarios se fijaron en formaldehído al 4% (P/V) y PBS durante 68 horas. El método empleado se basó en la metodología en el manual preparado para las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Las muestras fueron procesadas lavando con PBS, deshidratándose con etanol, siendo clarificadas y embebiendo los ovarios en parafina. Se cortaron muestras de 3µm de espesor, y fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE) de acuerdo con el método descrito por Prophet y Mills' [1995]. Las observaciones se realizaron en un microscopio Olympus BX41™ a 400X y 1000X de magnificación; las imágenes fueron capturadas usando una videocámara Evolution Pro ®. El procesamiento de las imágenes se realizó en ImagePro V. 6.0e. Se obtuvo un total de 33 imágenes donde el conteo folicular fue realizado manualmente usando una única sección por muestra tomada de la zona central-medular del ovario; la presencia de precipitados en algunas muestras influyó los resultados del conteo.

## **Hormonas**

Los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) en suero fueron medidos con los kits ELISA FSH-suero y LH-suero de la marca DRG®. En cada caso fue empleada una curva estándar proporcionada por el kit. Para este ensayo, se adicionaron 25 µL de estándar, control y muestras a cada pozo de la microplaca usando puntas desechables. Posteriormente, fueron agregados 100 µL de conjugado enzimático en cada pozo, mezclando exhaustivamente durante 10 segundos. La placa fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pozos fue agitado, lavando los pozos cinco veces con agua destilada (400 µL por pozo), golpeando fuertemente la placa sobre papel absorbente, removiendo gotas residuales. Después de dicho paso, se agregaron 100 µL de solución sustrato, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática fue detenida al añadir 50 µL de solución stop en cada pozo. Finalmente, la absorbancia fue determinada a 450 empleando un lector de microplacas de absorbancia en incubación marca BioTek ELx808™.

## **Pruebas estadísticas**

Los resultados de todos los análisis bioquímicos (proteínas carboniladas, lipoperoxidación, proporción GSH/GSSG, hormonas y conteo de estructuras foliculares) se muestran como el promedio ± error estándar de la media (SEM). Las comparaciones entre los grupos C (control o testigo), A (con

tratamiento anulado) y P (exposición crónica ininterrumpida) se realizaron con ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis para aquellos que no se comportaban de manera normal) y en aquellos que se encontraron diferencias significativas, se utilizó la prueba Post hoc de Dunnett. Se realizó la prueba T (Prueba no paramétrica U de Mann-Withney en caso de que los datos no presentaran los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas) para comparar el número de crías de las 2 generaciones que se cruzaron, así como la prueba de Chi cuadrada para determinar si existe dependencia entre la proporción de sexos y el grupo al que pertenecen. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPad Prism 8.0, los valores de  $p < 0.05$  (\*) o menos indican significancia estadística.

#### IV. RESULTADOS

##### i. Parámetros generales

Se obtuvo un total de 18 hembras para la 1ª generación (C:6, A:6 y P:6), 74 para la 2ª generación (C:20, A:31 y P:23) y 90 en la 3ª generación (C:30, A:30 y P:30). No se observaron diferencias significativas en los pesos (ANOVA, en (F0):  $F_{2,21} = 0.06027$ ,  $p = 0.9417$ ; (F1):  $F_{2,21} = 0.1630$ ,  $p = 0.8507$ ; y (F2):  $F_{2,21} = 1.985$ ,  $p = 0.1623$ ), ni en la ganancia de peso (Kruskal-Wallis, en (F0):  $H = 1.975$ ,  $p = 0.3724$ ; (F1):  $H = 0.4253$ ,  $p = 0.8084$ ; y (F2):  $H = 1.096$ ,  $p = 0.5781$ ) entre los tratamientos de cada generación. En la figura 4a se observa el promedio de peso corporal en todos los grupos, el cual fue de 28.88 g en F0 (C:29.3g, A:28.4g, P:29.1g), 30.94 gr en F1 (C: 30.92g, A:30.58g, P:31.31g) y 29 gr en F2 (C:28.1g, A:29.7g, P:29.2g), mientras que la ganancia de peso observada en la figura 4b, fue en promedio 26.42 g en F0 (C:25.88g, A:25.94g, P:27.44g), 29.18 g en F1 (C: 30.01g, A: 29.03g, P: 28.50g) y 19.32 g en F2 (C: 19.13g, A: 19.66g, P: 19.16g).

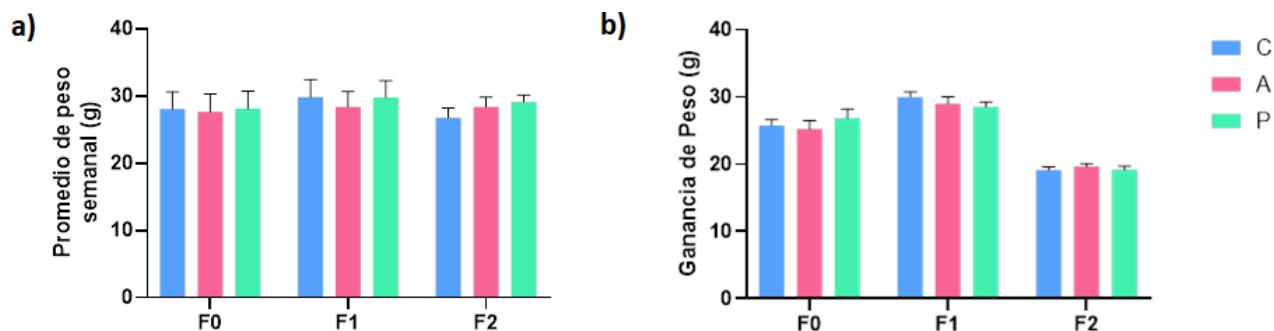


Figura 4. Comparación del (a) peso y (b) ganancia de peso de F0 (C:6, A:6 y P:6), F1 (C:20, A:31 y P:23) y F2 (C:30, A:30 y P:30) con 20 semanas de tratamiento ( $p > 0.05$ ).

El consumo de alimento (figura 5a) no difirió significativamente entre los tratamientos (ANOVA, en (F0):  $F_{2,21}= 1.818$ ,  $p= 0.1869$ ; (F1):  $F_{2,21}= 0.3891$ ,  $p= 0.6824$ ; y (F2):  $F_{2,21}=0.1273$ ,  $p= 0.8811$ ), mientras que el consumo de agua (figura 5b) sólo fue significativamente mayor en el grupo P de F1 ( $p <0.0001$ ), sin diferencias significativas entre los tratamientos en las demás generaciones (Kruskal-Wallis, en (F0):  $H= 2.313$ ,  $p= 0.3145$ ; ANOVA, en (F2):  $F_{2,21}=0.04042$   $p= 0.9605$ ). El promedio de consumo de alimento semanal en todos los grupos fue 13.10 gr en F0 (C:13.84, A:12.26, P:13.19), 12.23 gr en F1 (C: 11.64, A:12.38, P:12.66) y 10.97 gr en F2 (C:10.71, A:10.76, P:11.44). El promedio de consumo de agua semanal en todos los grupos de F0 fue de 14.93 mL (C:15.42, A:14.43, P:14.95), 15.58 mL en F1 (C: 14.71, A:17.31, P:14.73) y 18.96 mL en F2 (C:22.79, A:17.15, P:16.93).

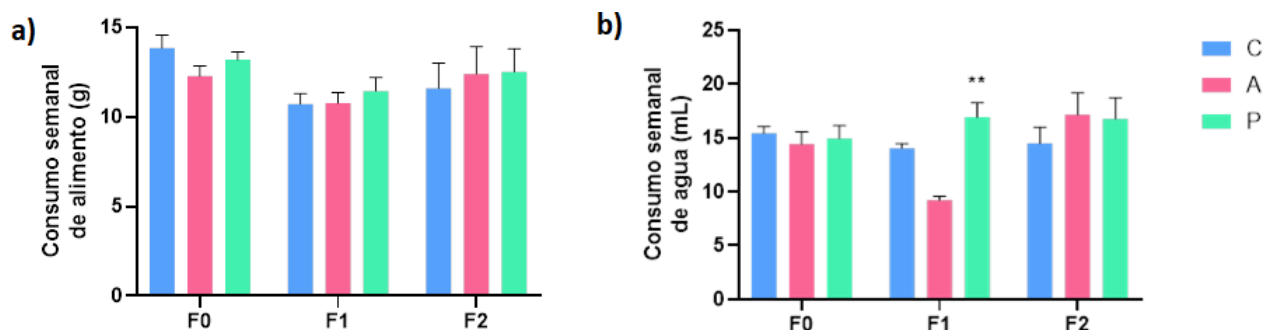


Figura 5. Consumo promedio de (a) alimento y de (b) agua de F0 (C:6, A:6 y P:6), F1 (C:20, A:31 y P:23) y F2 (C:30, A:30 y P:30). Posterior a 20 semanas de tratamiento, sólo se observó diferencia significativa en el consumo de agua del grupo P en comparación con C de F1 ( $p = 0.0082$ ).

En F0 y F1, la cruce se llevó a cabo en la 8ª semana de edad (2 ½ meses), la preñez comenzó en la 11ª-12ª semana aproximadamente. No se observó diferencia significativa en el número de crías paridas (ANOVA, en (F0):  $F_{2,15}=2.586$ ,  $p= 0.1084$ ; y (F1):  $F_{2,51}=0.1107$   $p= 0.8954$ ) (figura 6a), ni diferencia significativa en el peso al destetar (Kruskal-Wallis, en (F0):  $H= 3.424$ ,  $p= 0.1805$ ; y (F1):  $H= 6.647$ ,  $p= >0.9999$ ) (figura 6b), excepto en el grupo A respecto al grupo C en F1 ( $p= 0.0404$ ). El total de crías paridas en F0 fue de 64 para el grupo C, 54 para el grupo A y 59 para el grupo P; mientras que en F1 fue de 100 para el grupo C, 247 para el grupo A y 197 para el grupo P. Una vez separadas al destetar, el promedio de peso de hembras en todos los grupos de F0 fue de 9.52 g (C:9.5g, A:10.03g, P:9.04g) y 10.55 g en F1 (C:10.13g, A:11.30g, P:10.55g).

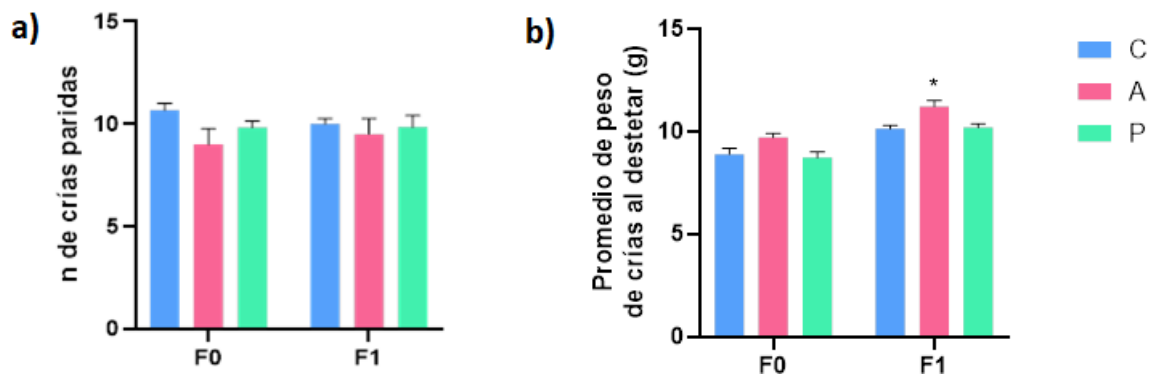


Figura 6. Comparación de la cantidad de (a) crías paridas y del (b) peso de crías paridas de F0 (C:6, A:6, P:6) y F1 (C: 20, A: 31, P: 23). Después de 20 semanas de tratamiento no se observó diferencia significativa entre el número de crías paridas entre los grupos de las distintas generaciones ( $p > 0.05$ ), mientras que el promedio de peso de crías paridas el grupo A de F1 fue el único que presentó diferencias significativas con respecto al control (testigo) ( $p < 0.05$ ).

Al comparar la proporción de sexos en los tres grupos de las dos generaciones, el análisis de  $\chi^2$  no demostró una asociación significativa entre la proporción de sexos y el grupo al que pertenecían las crías paridas de cada grupo (tabla II). Sin embargo, se observa una ligera tendencia hacia los machos en los organismos expuestos a Pb por lo que, de aumentarse la concentración, esta tendencia posiblemente sería más marcada.

Tabla II. Proporción de hembras y machos en ratones hembra con distintos tratamientos.

Grupo (Generación)	Machos	Hembras	p
C(F0)	51.22%	48.78%	0.2050
A(F0)	43.64%	56.36%	
P(F1)	60.34%	39.66%	
C(F1)	54.79%	45.21%	0.8128
A(F1)	57.56%	42.35%	
P(F1)	57.64%	42.36%	

En la figura 7 se observa que la proporción del peso de los ovarios con respecto al peso corporal no mostró diferencia significativa entre los grupos de F0 ( $p = 0.2742$ ). Sin embargo, en F1 se observó un aumento significativo del grupo P con respecto a C ( $p = 0.0377$ ); mientras que en F2, fue significativamente mayor en ambos grupos experimentales (A,  $p = 0.0096$  y P,  $p = 0.0179$ ). El porcentaje del peso ovárico con relación al peso corporal en todos los grupos fue 0.031% en F0 (C: 0.034%, A: 0.032%, P: 0.028%), 0.030% en F1 (C: 0.027%, A: 0.030%, P: 0.033%) y 0.032% en F2 (C:0.028%, A:0.033%, P:0.037%).

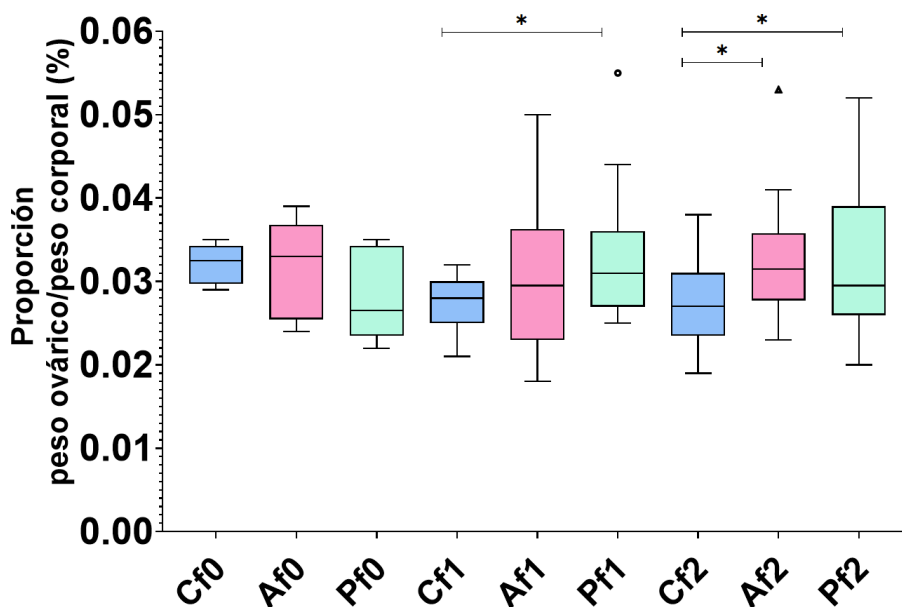


Figura 7. Comparación de la proporción entre peso de ovarios con peso corporal de F0 (C:6, A:6 y P:6), F1 (C:20, A:30 y P: 23) y F2 (C: 30, A:30 y P:30). Después de 20 semanas de tratamiento no se observó un aumento significativo en dicha proporción en el grupo P respecto a C en F1 ( $p>0.05$ ), así como un aumento significativo en los grupos A y P con respecto a C en F2 ( $p<0.05$ ).

## ii. Marcadores de estrés oxidante

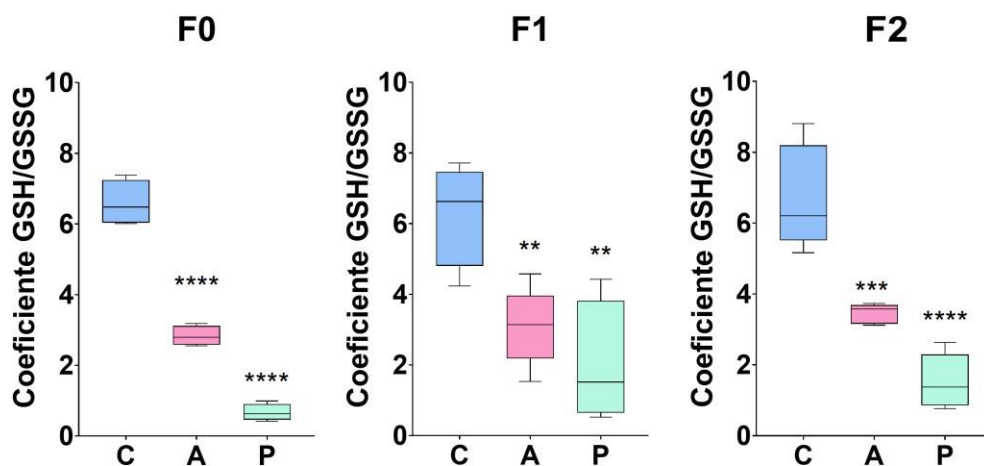


Figura 8. Coeficiente de relación de GSH/GSSG en homogenizado de ovario en hembras de F0 (C:4, A:4, P:4), F1 (C: 4, A: 6, P: 4) y F2 (C: 5, A: 5, P: 6). Posterior a 20 semanas de tratamiento, hubo diferencia significativa entre los grupos A y P con respecto a C en F0, F1 y F2.

La proporción de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) (en el cual los valores de 6 a 8 se consideran normales y valores inferiores a 1 patológicos) mostró que existe un estrés oxidante en las tres generaciones de los grupos A y P. El promedio del índice GSH/GSSG en F0 fue de 6.3372 (C), 2.8298 (A) y 0.6646 (P); en F1 fue de 6.3005 (C), 3.0928 (A) y 1.9935 (P); y en F2 fue de 6.7250 (C), 3.4522 (A) y

1.5333 (P). Las concentraciones tanto de GSH como de GSSG difirieron significativamente ( $p < 0.0001$ ) en grupos A y P con respecto a C en F0; esto se mantuvo en F1 (A,  $p = 0.0078$  y P,  $p = 0.0020$ ) y en F2 (A,  $p = 0.0002$  y P,  $p < 0.0001$ ) (figura 8). La figura 8 describiría entonces que el grupo C se encuentra dentro de los valores normales de relación de oxidación y reducción; el grupo A está presentando un estrés, sin embargo, los niveles de glutatión disponibles aún pueden contrarrestar el efecto oxidante; finalmente el nivel de GSH del grupo P es muy disminuido, lo que se traduce en un estrés oxidante mayor en el órgano pesar de haberse anulado el tratamiento desde la primera generación (grupo A).

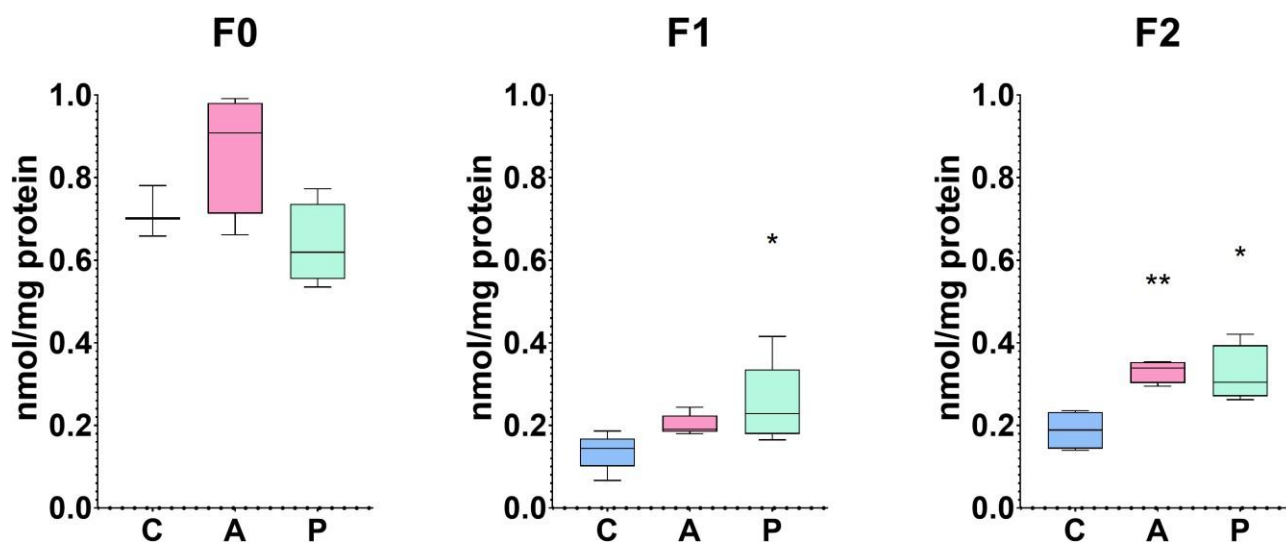


Figura 9. Proteínas carboniladas en homogenizado de ovario en hembras de F0 (C:3, A:4, P:3), F1 (C: 4, A: 6, P: 5) y F2 (C: 4, A: 5, P: 5). Donde posterior a 20 semanas de tratamiento, sólo se observaron diferencias significativas entre el grupo P ( $p < 0.05$ ) con respecto a C en F1 y de A y P ( $p < 0.05$ ) con respecto a C en F2.

En F0 se observó que el grupo P tuvo los niveles más bajos de proteínas carboniladas (PC) en comparación con los grupos A y C, aunque no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, en la generación F1 se observa que estos valores se invierten, siendo los niveles de PC significativamente mayores en el grupo P ( $p = 0.0258$ ) en comparación al control (testigo), no así en el grupo A, aunque los niveles sean ligeramente mayores. Finalmente, en F2 se mantiene esta diferencia significativa en el grupo P con respecto al control (testigo) ( $p = 0.0113$ ), mientras que el grupo A muestra un aumento significativo ( $p = 0.0080$ ) en los niveles de las PC (Figura 9). El promedio de proteínas carboniladas en F0 fue de 0.8135 (C), 0.8920 (A) y 0.5617 (P); en F1 fue de 0.1362(C), 0.2015 (A) y 0.2515 (P); y en F2 fue de 0.1881 (C), 0.3315 (A) y 0.3231 (P) nmol/mg de proteína.



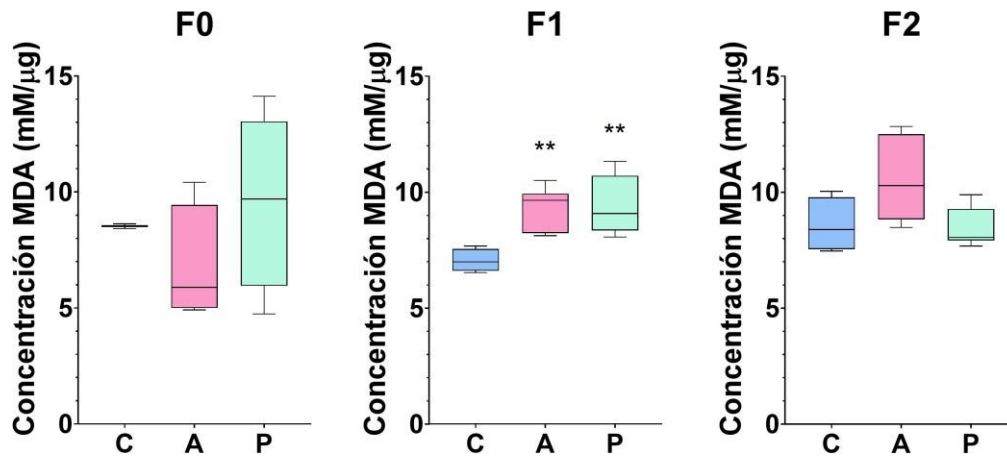


Figura 10. Niveles de TBARS en homogenizado de ovario ( $p > 0.05$ ) en hembras de F0 (C:2, A:4, P:4), F1 (C: 4, A: 6, P: 5) y F2 (C: 4, A: 6, P: 6). Después de 20 semanas de tratamiento sólo se observaron diferencias significativas entre el grupo A ( $p < 0.05$ ) y P ( $p < 0.05$ ) con respecto a C en F1.

En la lipoperoxidación, identificada por la producción de malondialdehído (MDA) o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), sólo se observaron diferencias significativas entre los grupos A ( $p = 0.0078$ ) y P ( $p = 0.0060$ ) con respecto al control (testigo) en la generación F1, mientras que en F0 y F2, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 10). El promedio de TBARS en F0 fue de 8.5205 (C), 6.7779 (A) y 9.5647 (P); en F1 fue de 7.0500 (C), 9.3245 (A) y 9.4176 (P); y en F2 fue de 8.5696 (C), 10.5352 (A) y 8.4568 (P) mM de MDA/ $\mu$ g de proteína (figura 10).

Al realizar las mediciones de la concentración de hormonas, es evidente que aún al haber una tendencia a la disminución de los niveles de las hormonas FSH y LH en ambos tratamientos de la primera generación (F0), sólo el grupo P mostró una disminución significativa en la concentración de LH en suero ( $p = 0.0368$ ), no así en FSH (Figura 11). Igualmente se observa que dichas concentraciones tampoco difirieron significativamente en las siguientes generaciones entre los grupos. El promedio de la concentración de FSH en F0 fue de 0.5795 (C), 0.5420 (A) y 0.5633 (P); en F1 fue de 0.5566 (C), 0.5541 (A) y 0.5466 (P); y en F2 fue de 0.5476 (C), 0.5463 (A) y 0.5756 (P) mIU/mL. El promedio la concentración de LH en F0 fue de 0.5340 (C), 0.5095 (A) y 0.4840 (P); en F1 fue de 0.5192 (C), 0.5100 (A) y 0.5152 (P); y en F2 fue de 0.5522 (C), 0.5622 (A) y 0.5536 (P) mIU/mL.

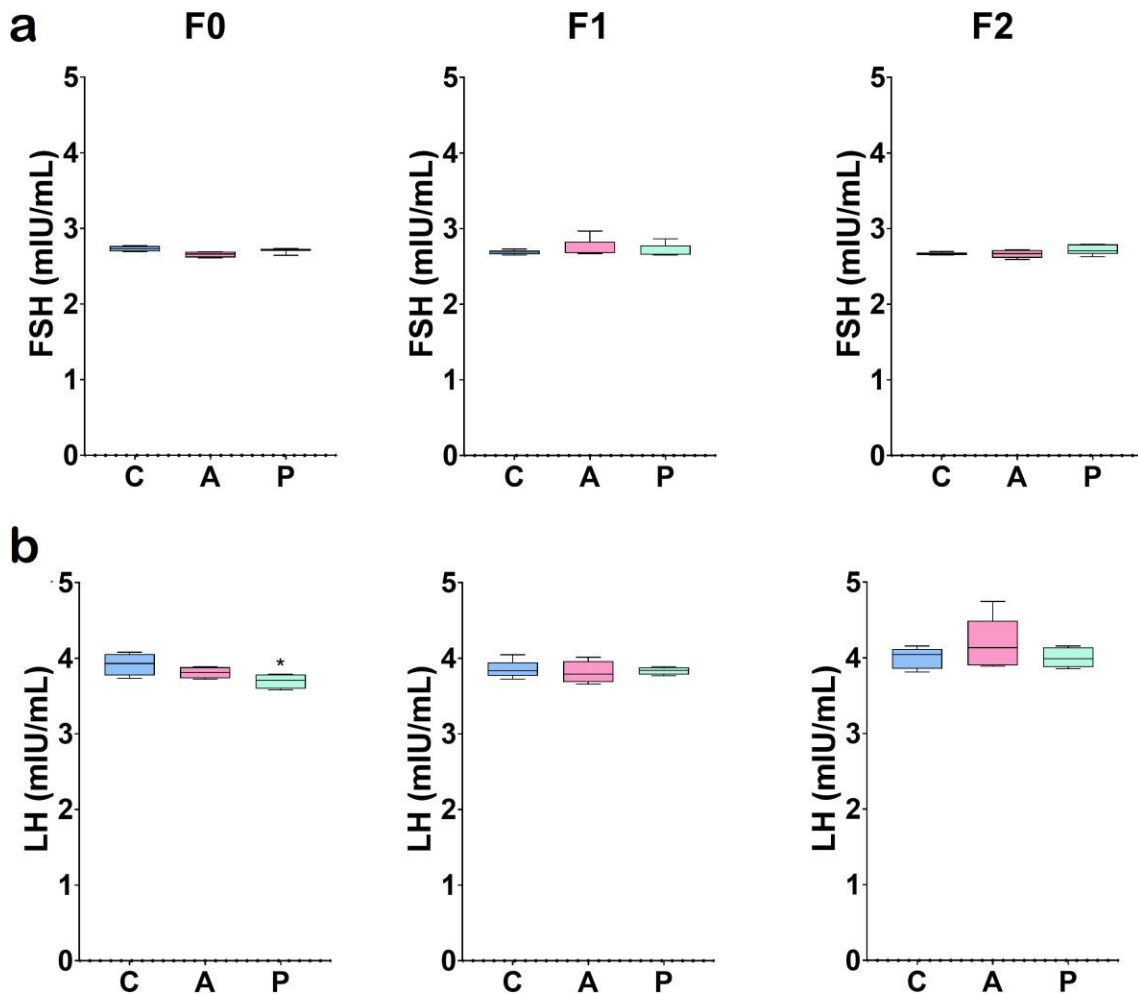


Figura 11. Concentración de (a) hormona foliculo estimulante y (b) hormona luteinizante en suero de hembras de F0 (C:4, A:4, P:4), F1 (C: 5, A: 5, P: 5) y F2 (C: 5, A: 5, P: 5). Posterior a 20 semanas de tratamiento, los niveles de LH fueron significativamente menores en el grupo P con respecto a C en F0 ( $p < 0.05$ ) (a), mientras que en las siguientes generaciones no hubo diferencias significativas entre los grupos. Los niveles de FSH (b) no difirieron significativamente en los tratamientos de todas las generaciones ( $p > 0.05$ ).

### iii. Conteo folicular y características histológicas

El grupo C presentó la mayor cantidad de folículos primordiales y en desarrollo (primarios y secundarios) en comparación con los grupos experimentales en F0 ( $p = 0.0110$ ), F1 ( $p = 0.0270$ ) y F2 ( $p = 0.0012$ ) en ambos grupos experimentales. Los folículos en desarrollo (primarios y secundarios) difirieron significativamente sólo en el grupo P ( $p = 0.0134$ ) respecto al control (testigo) en F0, mientras que ambos grupos tuvieron un número significativamente menor de folículos en desarrollo en comparación con el grupo control (testigo) en F1 (A,  $p = 0.0169$  y P,  $p = 0.0275$ ) y F2 (A,  $p = 0.0014$  y P,  $p = 0.0007$ ), (Figura 12).

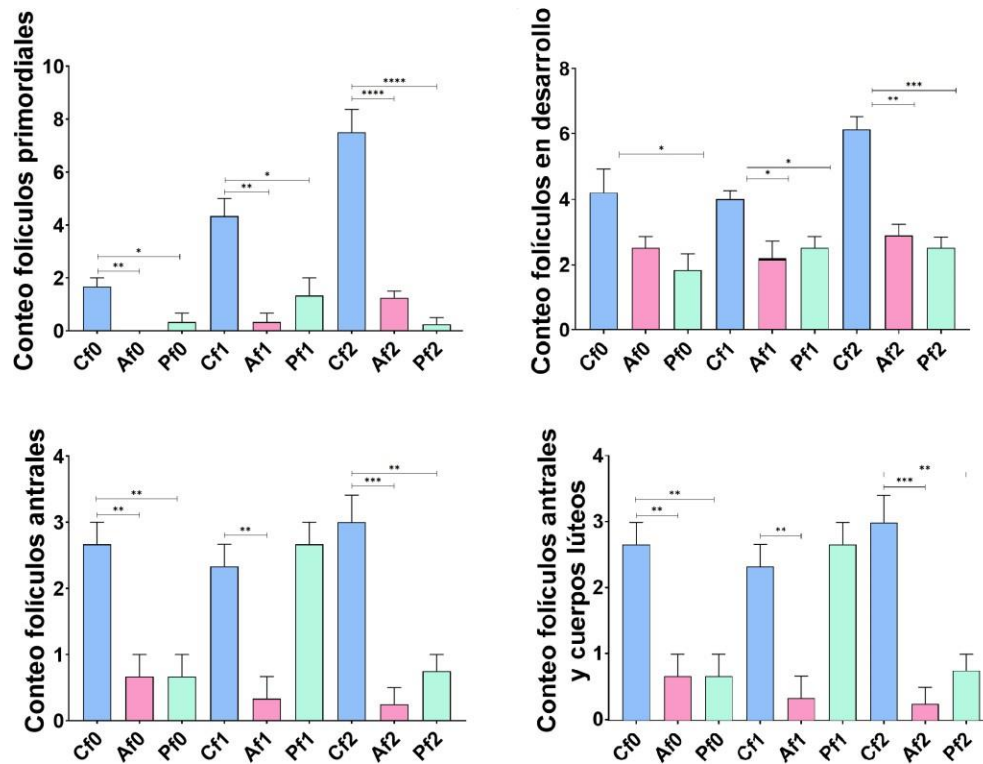


Figura 12. Conteo de estructuras foliculares. Las estructuras observadas fueron teñidas con el método de HE en ovarios derechos de ratonas CD1 con sus respectivos tratamientos en F<sub>0</sub> (C:4, A:4, P:4), F<sub>1</sub>(C:4, A:6, P:4), y F<sub>2</sub> (C:5, A:5, P:6) (\* p < 0.05, \*\* p < 0.005, \*\*\* p < 0.0005).

El número de folículos antrales observados fue significativamente mayor en el grupo C respecto a ambos grupos experimentales ( $p= 0.0080$ ) en F<sub>0</sub> y en F<sub>2</sub> ( $p=0.0003$ ); resulta interesante que en F<sub>1</sub>, el número de folículos antrales en el grupo C fuera sólo significativamente mayor que en el grupo A ( $p= 0.0097$ ) y que el grupo P tuviese una mayor cantidad de folículos antrales, pese a que el análisis no demostró diferencias significativas. Finalmente, el número de cuerpos lúteos y albicans varió significativamente en ambos grupos experimentales en F<sub>0</sub> (A,  $p=0.0068$  y P,  $p= 0.0311$ ), mientras que en F<sub>1</sub> no hubo diferencias significativas ( $p= 0.3966$ ) y en F<sub>2</sub>, sólo el grupo A mostró una diferencia significativa ( $p= 0.0226$ ) (Figura 12).

Se observaron alteraciones histológicas en los grupos experimentales de todas las generaciones, dentro de las cuales fueron recurrentes un leve engrosamiento del epitelio germinal, así como la pérdida de la cohesión de células de los folículos antrales y cuerpos lúteos; mientras el aumento en la vacuolación de células de la corteza ovárica ocurrió a partir de F<sub>1</sub> (Figura 14). Sólo a partir de F<sub>1</sub> se observó un daño más notorio en el ovario en general, así como aumento en la

vascularización, lo que podría indicar un proceso inflamatorio, el cual siguió presente en algunos organismos del grupo P y A en F2 (Figura 13 a 15).

## F0

En F0, el grupo C presentó características normales, varias estructuras foliculares en distintas etapas de desarrollo, incluidos los folículos primordiales, con epitelio germinal bien delimitado y sin cambios patológicos aparentes (Figura 14). Hubo vacuolación en las células que rodean las estructuras foliculares (Vac) en el grupo A, el cual presentó un epitelio ovárico ligeramente engrosado (▼). El grupo P presentó un engrosamiento del epitelio germinal más acentuado y parte de la corteza ovárica se encontró vacuolada. En los grupos experimentales, las estructuras foliculares fueron similares al grupo C, con estructuras íntegras y reconocibles (figura 13).

## F1

En F1, el grupo C no presentó cambios patológicos aparentes; el epitelio germinal presentó buena delimitación, las estructuras ováricas fueron normales (figura 15). En el grupo A, se observó vacuolación en las células que rodean las estructuras foliculares (Vac), con pocos o nulos folículos primordiales distinguibles; el epitelio ovárico ligeramente engrosado y con pérdida de estructura en algunas áreas (▼), así como precipitados, principalmente en cuerpo lúteo; el folículo antral no mantuvo la estructura típica (\*) (figura 15). El grupo P presentó un daño exacerbado en el tejido, donde las estructuras foliculares fueron menos distinguibles y hubo presencia de precipitados. En ambos grupos experimentales se observó un aumento en la vascularización (→), lo que podría indicar un proceso inflamatorio. Aun cuando este daño es evidente en los grupos experimentales, algunas estructuras foliculares mantenían una forma relativamente discernible del resto del tejido (figura 14).

## F2

En F2, el grupo C presentó características normales, varios folículos primordiales, secundarios y preantrales, así como cuerpos lúteos sin cambios patológicos aparentes, epitelio germinal bien definido (▼), con células de la granulosa hiperpigmentadas típicas del inicio de la degradación para la formación del cuerpo lúteo (figura 15). En el grupo A se observó disminución en la presencia de estructuras foliculares, engrosamiento y pérdida de una estructura definida en el epitelio ovárico (▼), pérdida de la

estructura general del cuerpo lúteo (\*), aumento en la vascularización, identificado por la presencia de eritrocitos en múltiples áreas del tejido (→), y precipitados en distintas áreas del tejido (figura 16). El grupo P presentó epitelio ovárico definido corteza ovárica con abundante daño al tejido, presencia moderada de precipitados, desprendimiento de las células que conforman al cuerpo lúteo (\*), y mayor vascularización que en el grupo P y A (→) (figura 15). En los grupos experimentales se pudo observar que el grupo A presentó características histológicas más parecidas al grupo A de F0. Más de la mitad del grupo P (3 de 5 organismos) continuó mostrando daño evidente en tejidos, mientras que los demás volvieron a presentar características similares a su grupo en F0.



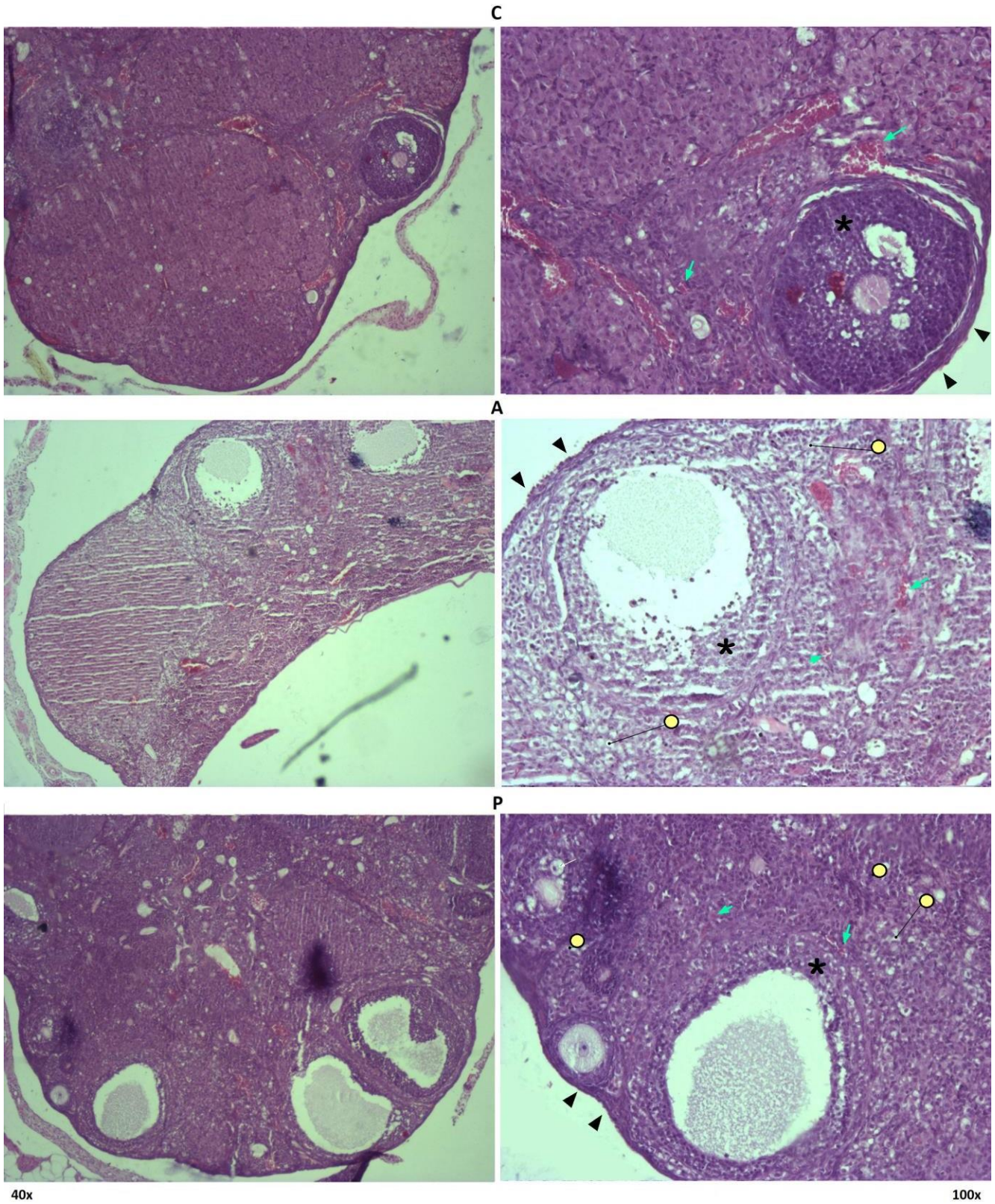


Figura 13. Corte histológico de ovario derecho (OD) en hembras de F0 pertenecientes a los grupos C, A y P (de arriba hacia abajo). Acercamiento a los folículos que liberaron al ovocito, donde se observan sólo un leve engrosamiento del epitelio germinal (▼), ligero aumento en la vascularización del tejido (→), así como unas cuantas células estructurales vacuoladas (\*). 400 y 1000X



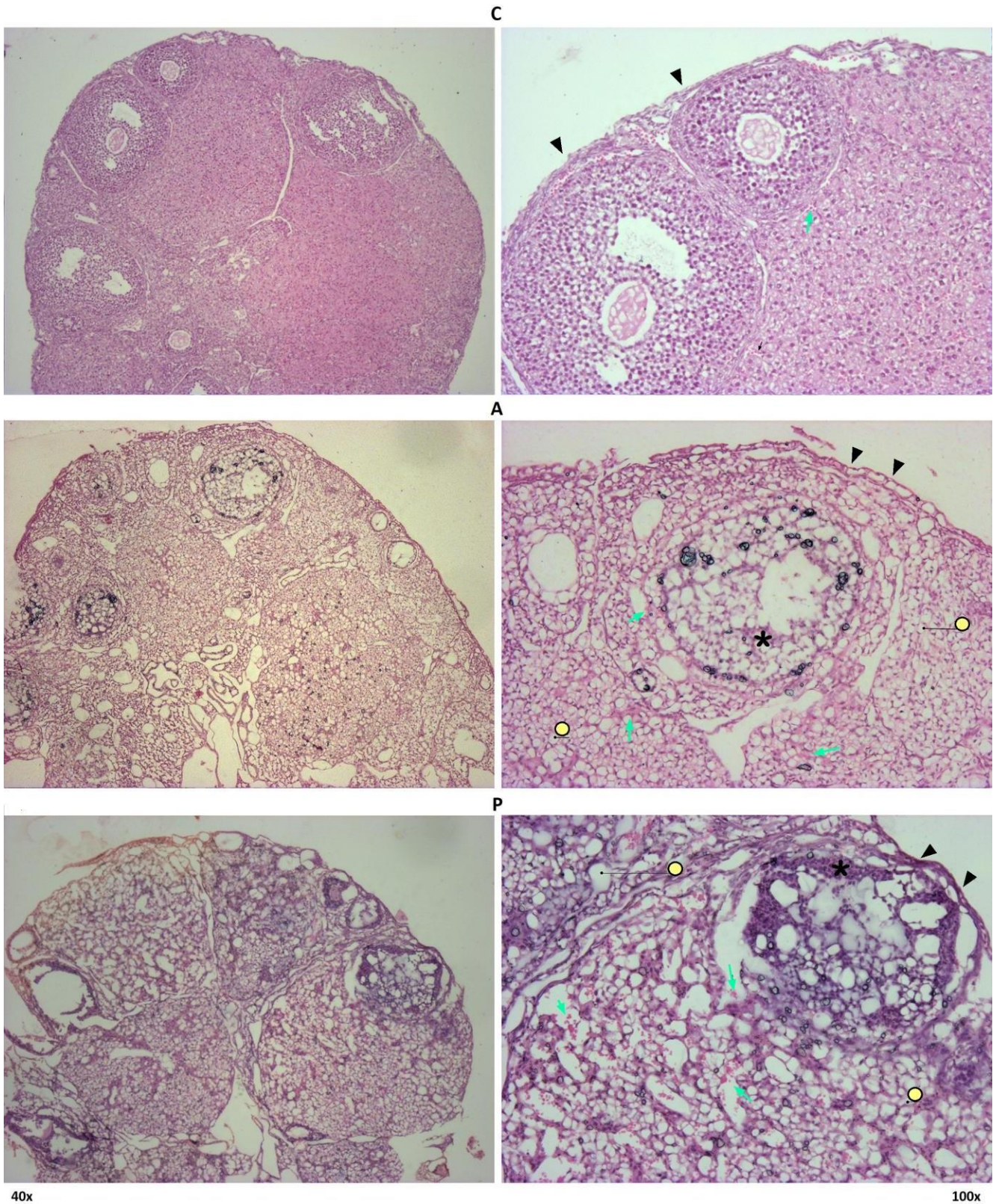


Figura 14. Corte histológico de ovario derecho (OD) en hembras de F1 pertenecientes a los grupos C, A y P (de arriba hacia abajo). Acercamiento a los folículos que liberaron al ovocito, epitelio germinal ligeramente engrosado (▼), células estructurales vacuoladas (\*), daño las estructuras foliculares (\*) y aumento en la vascularización del tejido (→) en grupos experimentales. 400 y 1000X.



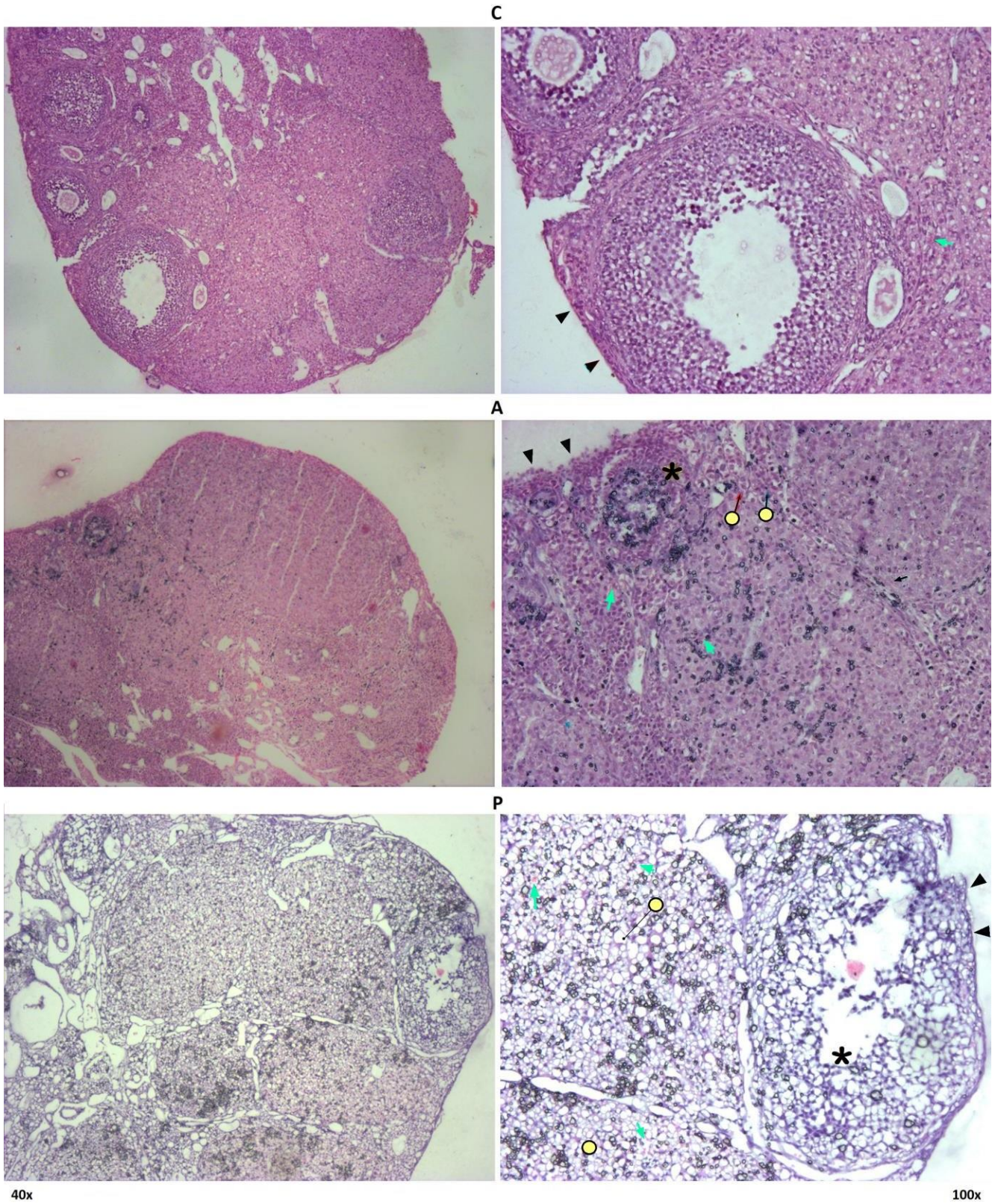


Figura 15. Corte histológico de ovario derecho (OD) en hembras de F2 pertenecientes a los grupos C, A y P (de arriba hacia abajo). En C, se observa un epitelio germinal bien definido (▼), así como el inicio del aumento en la vascularización típica en el cuerpo lúteo (→), así como células de la granulosa comenzando a degradarse para formar al cuerpo lúteo; en A, se observa engrosamiento del epitelio germinal (▼), células vacuoladas (•) y estructuras foliculares dañadas (\*), mientras que en P sigue observándose un daño agudo en todo el tejido ovárico en general, con aumento considerable de vascularización y vacuolación celular . 400 y 1000x.



## V. DISCUSIÓN

Los metales pesados son capaces de producir ERO que dañan componentes celulares [Gurer y Ercal, 2000; Ercal *et al.*, 2001]y, si bien el plomo (Pb) no puede sufrir modificaciones REDOX [Ercal *et al.*, 2001], provoca estrés oxidante (EO) y daño al DNA por otras vías [Gurer y Ercal, 2000; Ercal *et al.*, 2001; Flora *et al.*, 2012]. Por ejemplo, el Pb estimula a la xantina oxidasa (una molécula prooxidante) e inhibe la actividad de enzimas antioxidantes como CAT, SOD y GPx, lo que aumenta considerablemente los niveles de ERO celulares [Ariza *et al.* 1998; Ahamed y Siddiqui, 2007; Kasperczyk *et al.*, 2013].

Aunado a esto, el Pb tiene la capacidad de formar enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilos (-SH) de proteínas, inactivándolas o modificando su función y afectando moléculas como el glutati6n reducido (GSH), donde la uni6n del Pb al -SH de este disminuye sus niveles significativamente [Patrick, 2006; Ahamed y Siddiqui, 2007; Neupane y Pecoraro, 2011; Jangid *et al.*, 2011; Mah y Jalilehvand, 2013]. Empero de tener una vida media muy corta, las consecuencias generadas por las ERO afectan procesos importantes que generan EO severo [Zarkovic, 2020].

La capacidad antioxidante de los organismos es importante para mantener la salud celular, donde el GSH es el mayor determinante del balance intracelular. Por esta raz6n, la relaci6n GSH/GSSG es un indicador importante del potencial REDOX. En un individuo saludable, los niveles de GSH ser6n mayores que del glutati6n oxidado (GSSG) [Carlberg y Mannervik, 1985], sin embargo, en este trabajo la relaci6n de GSH/GSSH fue significativamente desbalanceada en las tres generaciones de los grupos experimentales, indicando EO. Esto podr6a deberse tanto a la inactivaci6n ya mencionada, pero el Pb tambi6n inhibe la actividad de la glutati6n-reductasa (GR), la cual convierte al GSSG en GSH, lo que ralentiza la regeneraci6n de GSH y aumenta la susceptibilidad al da1o oxidante [Carlberg y Mannervik, 1985; Hunaiti y Soud, 2000].

El desequilibrio observado refleja desregulaciones en la actividad enzim6tica, comprometiendo del transporte celular, de la transducci6n de se1ales y la expresi6n g6nica mediada por factores de transcripci6n 6ntimamente ligados a la proporci6n de GSH/GSSG, as6 como una capacidad antioxidante severamente disminuida [Neupane y Pecoraro, 2011; Mah y Jalilehvand, 2013]. Es notable que en este estudio ocurra una alteraci6n significativa de GSH/GSSG incluso en aquellos organismos en que se anul6 el tratamiento desde la primera generaci6n, ya que lo observado en este trabajo se ha relacionado con EO severo en sangre e h6gado [Gurer-Orhan *et al.*, 2004; Hasanein *et al.*, 2016].

El EO tendrá un impacto importante en procesos como la oxidación (o carbonilación) de proteínas, la cual se da de manera natural en las células [Fedorova, 2017] pero que, al haber un desbalance en estas modificaciones, generará distintos procesos patológicos con gran impacto en la salud celular [Suzuki *et al.*, 2010]; al respecto, se ha observado que féminas que presentan enfermedades en las que se desarrollan quistes ováricos muestran un aumento en los niveles de PC [Kandasamy *et al.*, 2010; Jan *et al.*, 2015]. Resulta intrigante que en la primera generación de este estudio, el grupo experimental mostró niveles de proteínas carboniladas menores al grupo control (testigo), mientras que en las siguientes generaciones, estos niveles fueron significativamente mayores en el grupo experimental; esto podría deberse a que el organismo responde efectivamente al contaminante al ser expuesta en otra etapa de su vida, pero que la exposición durante la gestación y la lactancia de las generaciones siguientes afecte la capacidad del organismo para lidiar con la carbonilación proteica.

Este aumento también se ha observado durante exposiciones a altas concentraciones de Pb en células de la granulosa [Aglan *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2020], sanguíneas y hepáticas [Gurer-Orhan *et al.*, 2004; Quintanar-Escorza *et al.*, 2010; Kasperczyk *et al.*, 2012; Hasanein *et al.*, 2016], planteando la posibilidad de que la exposición crónica a baja concentración tiene la capacidad para dañar a los componentes celulares ováricos de manera similar a exposiciones agudas a altas concentraciones. Pese a no haber diferido significativamente en la primera generación, es evidente que los ovarios de este estudio presentan un EO proteico importante en generaciones siguientes que puede asociarse a múltiples enfermedades crónico-degenerativas [Dalle-Donne *et al.*, 2003].

Cuando un organismo está bajo EO, los fosfolípidos membranales pueden ser seriamente afectados [Halliwell y Chirico, 1993]; al respecto, se sabe que el Pb ejerce efectos sobre la estructura, funciones membranales, así como algunas enzimas y proteínas transmembranales [Gurer y Ercal, 2000; Ahamed y Siddiqui, 2007; Kirberger *et al.*, 2013], incrementando la lipoperoxidación (MDA/TBARS) en ovarios y otros compartimentos [Xu *et al.*, 2007; Nampoothiri y Gupta, 2008; Shafiq-ur-Rehman, 2013]. Al respecto, se sabe que La peroxidación lipídica representa un mecanismo importante de daño tisular asociado al envejecimiento y enfermedades como el síndrome de ovario poliquístico poliquístico (SOP) y cáncer ovárico [Behrman *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2019].

En el presente trabajo, los niveles de TBARS sólo aumentaron significativamente en los grupos experimentales de la generación donde las células vacuoladas y espacios en blanco en el ovario fueron

más evidentes, aunque otros trabajos han reportado una modificación importante en este marcador a concentraciones un poco más elevadas que la empleada en el presente estudio [Nampoothiri y Gupta, 2008]. Lo observado podría deberse en parte a que la concentración empleada es considerablemente menor que la evaluada en otros trabajos y, aunque el comportamiento de este marcador pareciera ir de la mano con la alteración histológica observada en ovarios, se necesitarían más análisis para corroborar o refutar esta posibilidad.

Se ha reportado que el estradiol y el estrógeno ejercen un efecto protector ante la lipoperoxidación en hembras [Komura, 1986; Huh *et al.*, 1994; Vedder *et al.*, 1999], sin embargo, esto no sería suficiente para explicar lo observado, ya que el índice de GSH/GSSG y los niveles de PC sí se vieron significativamente afectados, por lo que estos resultados podrían deberse a otros factores además de la baja concentración empleada; tampoco sería prudente descartar el hecho de que lo observado pudiese ser una respuesta adaptativa en los organismos de los grupos experimentales para proteger la integridad celular.

Esto es importante ya que la exposición a Pb, así como el aumento de dichos marcadores se han asociado con la alteración del eje hipotálamo-hipófisis, reduciendo la respuesta de hormonas importantes para la maduración sexual [Doumoutchis *et al.*, 2009]. La exposición crónica a 0.20 ppm de Pb durante 4 ½ a 5 meses en diestro de ratones durante tres generaciones de este estudio sólo provocó una disminución en la concentración de la LH en la primera generación expuesta crónicamente, mientras que los niveles de FSH no cambiaron en ninguna generación. El hecho de que FSH y LH cuentan con distintos patrones de secreción [McNeilly *et al.*, 2003] podría explicar por qué ambas hormonas no fueron afectadas de la misma manera. La recuperación de la LH en generaciones siguientes, así como el mantenimiento de la FSH en las tres generaciones del grupo experimental podría deberse en parte al tiempo que duró el tratamiento, o bien, lo observado en el presente estudio puede deberse a una respuesta adaptativa.

Sería incorrecto asumir a partir de estos resultados que la exposición crónica no afectaría la capacidad reproductora ya que, por ejemplo, la disminución en los niveles de LH observada en la primera generación, se ha asociado a la insuficiencia ovárica prematura (IOP) o desórdenes en el hipotálamo [Razi *et al.*, 2021]. Aunque las concentraciones de Pb en las que se ha reportado una alteración importante en la concentración hormonal suelen ser elevadas [Ronis *et al.*, 1996; Doumoutchis *et al.*, 2009; Salim-Hamed *et al.*, 2014; Trojnar *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2020], se ha reportado que la exposición

a 0.15 ppm de Pb durante 12 meses disminuye los niveles séricos de FSH, estradiol y progesterona, incrementando los niveles de LH y testosterona en el proestro de ratas [Dumitrescu *et al.*, 2014 y 2015], por lo tanto, no es posible asumir que no existan alteraciones en los picos hormonales de otras etapas del ciclo estral que no fueron analizadas; sería interesante realizar trabajos que complementen lo observado para entender por qué sucede esto a bajas concentraciones y si estos efectos podrían exacerbarse durante tratamientos más prolongados.

Todo lo anterior está íntimamente relacionado con los cambios estructurales y funcionales cíclicos en los ovarios durante la etapa reproductiva, donde la integridad estructural de este, y la función de las ERO como segundos mensajeros son vitales en la manutención de la capacidad reproductora femenina, siendo el ovario derecho el más activo y sensible de los dos [Wiebold y Becker, 1987; Sharma, *et al.*, 2012 b]. Debido a que todos los ovarios analizados histológicamente fueron derechos, y a que el diestro es la etapa en la que hay menor fluctuación de ERO, las modificaciones observadas en este trabajo reflejan una alteración que afectará la capacidad reproductora femenina de manera sutil, pero tangible.

Aunado a esto, el aumento de peso ovárico observado ha sido asociado con patologías en humanos como los edemas o torsiones ováricas [Cass, 2005; Andre *et al.*, 2017], así como el síndrome de ovario poliquístico (SOP), que a su vez se relaciona con procesos patológicos como el aumento de hormonas masculinas, hipotiroidismo, tumores pseudo inflamatorios, ooforitis, entre otros [Stephen, 1995; Hansen *et al.*, 1997; Chang, 2007; Puzigaic *et al.*, 2009; Lalwani *et al.*, 2011], indicando potenciales alteraciones devenidas de la exposición a Pb a largo plazo. Se sabe que el desbalance de ERO durante la exposición a Pb provoca la muerte fisiológica del óvulo, infertilidad, insuficiencia ovárica prematura (IOP) e irregularidades en el ciclo estral [Hilderbrand *et al.*, 1973; Dhir y Dhand, 2010; Ray *et al.*, 2012; Sharma y Battacharya, 2014; Waseem *et al.*, 2014; Dumitrescu *et al.*, 2015; Agarwal *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Buck, 2018; Kumar, 2018; Liu *et al.*, 2019]

Debido a esto, se esperaría que la capacidad para quedar preñadas, así como el número de partos se viera seriamente afectado; es interesante entonces que la cantidad de hembras preñadas, así como el número de crías paridas con normo peso no difirieron del grupo control o testigo, pese a que el grupo experimental presentara modificaciones en la histoarquitectura, aumento de peso ovárico y alteración en la duración de las fases del estro en el ciclo estral (datos no mostrados), similar a lo reportado en trabajos con otras especies [Franks *et al.*, 1989; Dhir y Dhand, 2010]. La disminución de estas afecciones

con el pasar de las generaciones podría indicar una respuesta adaptativa multigeneracional, sin embargo, se esperaría que las alteraciones histológicas observadas se exacerbaban al mantener la exposición durante más tiempo en una misma generación [Taupeau *et al.*, 2001; Panwar *et al.*, 2011; Qureshi y Sharma, 2012; Sharma *et al.*, 2012a], por lo que no es posible aseverar que las generaciones posteriores tengan una adaptación y/o recuperación total a estos problemas.

Pese a usar concentraciones de Pb menores que en otros estudios, hubo alteraciones histológicas incluso en los grupos donde se anuló el tratamiento, lo cual podría relacionarse a trabajos previos donde se estimó que el daño a las estructuras y funciones ováricas se deben tanto a la exposición incidental, como al Pb acumulado [Taupeau *et al.*, 2001; Qureshi *et al.*, 2010]. Aunado a esto, las modificaciones observadas en el grupo con tratamiento anulado también fueron observables en las generaciones siguientes, ya que el Pb puede traspasar la barrera placentaria, acumulándose y afectando al ovario de las crías en desarrollo [Krieg y Feng, 2011; Taupeau *et al.*, 2001; Waseem *et al.*, 2014].

Dentro de los efectos que ejerce el Pb en ovarios se encuentran la pérdida en la organización de estructuras ováricas, aumento de la atresia folicular y disminución en la cantidad de folículos disponibles, ya sea debido a la afección en la reserva folicular o al efecto directo sobre los folículos más maduros [Lefevre 2001; Taupeau *et al.*, 2001 y 2003; Dhir y Dhand, 2010; Junaid *et al.*, 2010; Panwar *et al.*, 2011; Qureshi y Sharma, 2012 a y b; Jasim-Sodani, 2017]. En este estudio se observa alteración en el epitelio germinal, vacuolación de las células de la corteza ovárica, así como disminución en la mayoría de las estructuras foliculares en los grupos experimentales desde la primera generación, lo cual concuerda con el EO medido en las muestras ováricas, aún si no se observaran alteraciones hormonales significativas. El hecho de que dichos daños se exacerbaban en la segunda generación y disminuyeran en algunos individuos de la tercera podría ser un indicio de una adaptación generacional al estrés inducido por la exposición, sin embargo, surge la interrogante sobre posibles secuelas en etapas de vida posteriores.

Los efectos mencionados son de gran relevancia en temas de salud pública debido a la prevalencia del Pb en el ambiente y a su uso industrial en países en desarrollo [Doumouchtsis *et al.*, 2009; Sharma y Battacharya, 2014; Junaid *et al.*, 2010; Resongles *et al.*, 2021]. Aunado a esto, los niveles de Pb son significativamente mayores en mujeres con tumores ováricos malignos, SOP, y mujeres infértiles en comparación con mujeres saludables, afectando la capacidad reproductora a largo plazo [ATSDR, 2017; Cerna *et al.*, 2012; Hsiao-Ling *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Canaz *et al.*, 2017]. Además, se ha reportado la capacidad del Pb y otros contaminantes de afectar de manera multigeneracional la

fisiología gonadal y el comportamiento en modelos murinos durante períodos prolongados de exposición [Lukacinova *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2020; Rahman *et al.*, 2021] y que dicha exposición no afectará de la misma manera a distintas generaciones [Sobolewski, 2020].

Aunado a esto, existe evidencia indirecta que demuestra que el Pb provoca alteraciones epigenéticas y genéticas en humanos que pueden ser transmitidas incluso a las nietas de las mujeres expuestas [Sen *et al.*, 2015; Sobolewski *et al.*, 2020]. Por esta razón, la exposición de una generación podría afectar a generaciones postreras aún con la anulación de tratamiento y de una reproducción exitosa, ya que gametos alterados pueden contribuir con el aumento de EO en generaciones siguientes pese a que los parámetros generales sean normales [Lukacinova *et al.*, 2012, Sen *et al.*, 2015].

La importancia del presente estudio radica en que la exposición a una baja concentración, en comparación con trabajos anteriores, provocó la alteración de marcadores biológicos asociados al estrés oxidante e histología ovárica en distintas generaciones aún con la anulación del tratamiento, comprobando que en efecto no existe una concentración de Pb que pueda considerarse segura [ATSDR, 2017], lo que provocará daños indetectables a simple vista sobre la integridad ovárica. Se considera que los efectos deletéreos asociados a la exposición a Pb son un conjunto de alteraciones simultáneas a distintos niveles que provocarán estrés oxidante, por lo que es importante plantear futuras investigaciones complementando lo observado con otras técnicas que nos permitan evaluar de manera integral y precisa los efectos potenciales que la exposición crónica a bajas concentraciones de Pb podría ejercer sobre la integridad ovárica de varias generaciones de hembras, así como la capacidad de adaptación generacional de estas.

## VI. CONCLUSIONES

- La exposición crónica a una baja concentración de Pb afecta el cociente de peso de los ovarios/peso corporal en la descendencia.
- El tratamiento no tuvo una asociación significativa con la proporción de sexos, hubo una ligera tendencia en el aumento de machos de crías cuyas madres fueron expuestas.
- El número de crías paridas y su peso al destete no fue afectado por el tratamiento con Pb.
- La exposición a una baja concentración de Pb en agua para beber provocó modificaciones en marcadores relacionados al estrés oxidante.

- Aunque se anule el tratamiento, la exposición crónica a baja concentración de Pb provocó una disminución en la disponibilidad de GSH, representado por el índice GSH/GSSG.
- El tratamiento con Pb promovió la carbonilación de proteínas en la descendencia, aún al anular el tratamiento.
- Los marcadores de la lipoperoxidación aumentaron en la segunda generación, aún con la anulación del tratamiento.
- La exposición crónica a Pb no modificó significativamente los niveles hormonales en suero de hembras expuestas de generaciones siguientes.
- La exposición a concentración baja de Pb provocó alteraciones en componentes histológicos del ovario, exacerbados en la segunda generación.
- La exposición a baja concentración de Pb provocó disminución en el número de estructuras foliculares en los ovarios de hembras, aún con la anulación del tratamiento.

## VII. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos y discutidos en el presente estudio plantean algunas perspectivas para realizar experimentos futuros que se pueden encaminar con distintos abordajes:

1. El primer objetivo estaría dirigido a determinar si la administración crónica a una baja concentración de Pb afectará los niveles hormonales y marcadores de estrés oxidante en otras etapas del ciclo estral, si esto también se verá exacerbado al aumentar el período de exposición o en edades avanzadas.
2. El segundo objetivo propuesto estaría dirigido a implementar varias cruces de una hembra durante su edad reproductora, para observar si el tamaño de las camadas es mermado debido al tratamiento administrado y las consecuencias epigenéticas en más de tres generaciones.
3. En un tercer objetivo se determinaría si el tratamiento crónico a baja concentración afecta otros marcadores hormonales como testosterona, progesterona y estradiol; así como otros marcadores de estrés oxidante, como NADPH, xantina oxidasa, análisis de ERO por dicloro fluoresceína, enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR), entre otros, durante un período más prolongado de exposición, ahondando en los mecanismos moleculares con herramientas computacionales como el docking molecular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Agarwal, A., Gupta, S. y Sharma, R.K. (2016). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3 (1), 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- ✓ Agency for Toxicity Substances and Disease Registry (2017, June 12). Safety Standards for Lead Levels. [https://www.atsdr.cdc.gov/csem/leadtoxicity/safety\\_standards.html](https://www.atsdr.cdc.gov/csem/leadtoxicity/safety_standards.html) Acceso el 25/Nov/2021
- ✓ Aguilera, A., Bautista, F., Delgado, C., Gogichaichvili, A., Cejudo, R., Gutiérrez-Ruiz, M.E., Cenicerós-Gómez, A.E. y López-Santiago, N.R. (2019). Spatial analysis of lead in the street dust of Mexico City: implications for human health. *Journal of Environmental Sciences and Public Health*, 3(2),210-225. <https://doi.org/10.26502/jesph.96120058>
- ✓ Aglan, H.S., Gebremedhn, S., Salilew-Wondim, D., Neuhof, C., Tholen, E., Holker, M., Schellander, K. y Tesfayem, D. (2020). Regulation of Nrf2 and NF-κB during lead toxicity in bovine granulosa cells. *Cell and Tissue Research*, 380, 643-655. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03177-x>
- ✓ Ahamed, M. y Siddiqui, M.K. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clinical Chimica Acta*, 383 (1-2), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.024>
- ✓ Andre, L.C., Illangasekare, T. y Poder, L. (2017). Massive ovarian edema, due to adjacent appendicitis. *Emergency Radiology*, 24 (2), 215-218. <https://doi.org/10.1007/s10140-016-1436-8>
- ✓ Ariza, M.E., Bijur, G.N. y Williams, M.V. (1998). Lead and mercury mutagenesis: Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31(4), 352-361. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1998\)31:4%3C352::AID-EM8%3E3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1998)31:4%3C352::AID-EM8%3E3.0.CO;2-K)
- ✓ Ayowale, E.A. (2014). Changes in the lead concentration in air and soil during house deconstruction and demolition: Case study Springwells, Detroit, Michigan. *Wayne State University Thesis*. Paper 337.
- ✓ Balasch, J. y Fabregues, F. (2006). LH in the follicular phase: neither too high nor too low. *Reproductive Biomedicine Online*, 12, 406-415. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61991-8](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61991-8)
- ✓ Behrman, H.R. y Preston, S.L. (1989). Luteolytic actions of peroxide in rat ovarian cells. *Endocrinology*, 124, 2895-2900.
- ✓ Behrman, H.R., Kodaman, P.H., Preston, S.L. y Gao, S. (2001). Oxidative stress and the ovary. *Reproductive Sciences*, 8, 40-41. <https://doi.org/10.1177%2F1071557601008001S13>
- ✓ Benavides, F.J. y Guénet, J.L. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. Editorial Universidad de Alcalá de Henares. 1ª Edición. España. 310 pp.



- ✓ Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2), 3-8. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80077-3)
- ✓ Biasioli, M., Barberis, R. y Ajmone-Marsan, F. (2006). The influence of a large city on some soil properties and metals content. *Science of the Total Environment*, 356 (1–3), 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.04.033>
- ✓ Bindler, R. (2011). Contaminated lead environments of man: Reviewing the lead isotopic evidence in sediments, peat, and soils for the temporal and spatial patterns of atmospheric lead pollution in Sweden. *Environmental Geochemistry and Health*, 33, 311–329. <https://doi.org/10.1007/s10653-011-9381-7>
- ✓ Bires, J., Maracek, I., Bartko, P., Biresova, M. y Weissova, T. (1995). Accumulation of trace elements in sheep and the effects upon qualitative and quantitative ovarian changes. *Veterinary and Human Toxicology*, 37, 349–356.
- ✓ Bloom, M.M., Louis, G.M., Sundaram, R., Kostyniak, P.J. y Jain, J. (2011). Associations between blood metals and fecundity among women residing in New York State. *Reproductive Toxicology*, 31 (2), 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.09.013>
- ✓ Boveri, A. (1999). Antioxidantes: efectos biológicos y sobre el envejecimiento. *Folia Dermatológica Peruana*. 10(4). Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/fofia/Vol10\\_N4/antioxidantes.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/fofia/Vol10_N4/antioxidantes.htm) . Acceso el [03/Agosto/2017](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/fofia/Vol10_N4/antioxidantes.htm)
- ✓ Bruno-Nascimento, C.R., Ezequiel-Risso, W. y Reis-Martinez, C.B. (2016). Lead accumulation and metallothionein content in female rats of different ages and generations after daily intake of Pb-contaminated food. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 272-277. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.001>
- ✓ Buck, T. (2018). Role of ROS and ROS generating enzymes in the human ovar. Bachelor's thesis, *Der Ludwig-Maximilians-Universität München*, 96 pp. <https://doi.org/10.5282/edoc.22901>
- ✓ Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L. y Taft, R.A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *Plos ONE*, 7 (4), e35538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- ✓ Canaz, E., Kilinc, M., Sayar, H., Kiran, G. y Osyurek, E. (2017). Lead, selenium and nickel concentrations in epithelial ovarian cancer, borderline ovarian tumor and healthy ovarian tissues.

*Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 43, 217-223.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.05.003>

- ✓ Caravanos, J., Dowling, R., Téllez-Rojo, M., Cantoral, A., Kobrosly, R., Estrada, D., Orjuela, M., Gualtero, S., Ericson, B., Rivera, A. y Fuller, R. (2014). Blood lead levels in Mexico and pediatric burden of disease implications. *Annals of Global Health*, 80 (4), 269-277.  
<https://doi.org/10.1016/j.aogh.2014.08.002>
- ✓ Caravanos, J., Carrelli, J., Dowling, R., Pavilonis, B., Ericson, B. y Fuller, R. (2016). Burden of disease resulting from lead exposure at toxic waste sites in Argentina, Mexico, and Uruguay. *Environmental Health*, 15 (72), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0151-y>
- ✓ Carlberg, I. y Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484-490.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4)
- ✓ Cass, D.L. (2005). Ovarian Torsion. *Seminars in Pediatric Surgery*, 14 (2), 86-92.  
<https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2005.01.003>
- ✓ CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2010). Guidelines for the identification and management of lead exposure in pregnant and lactating women. US Department of Health and Human Services.
- ✓ Cerna, M., Krskova, A., Cejchanova, M. y Spevackova, V. (2012). Human biomonitoring in the Czech Republic: An overview. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215, 109-119.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.09.007>
- ✓ Chang, S.H., Cheng, B.H., Lee, S.L., Chuang, H.Y., Yang, C.Y., Sung, F.C. y Wu, T.N. (2006). Low blood lead concentration in association with infertility in women. *Environmental Research*, 101, 380-386.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.10.004>
- ✓ Chang, R.J. (2007). The reproductive phenotype in polycystic ovary syndrome. *Nature Clinical Practice Endocrinology: Metabolism*, 3(10), 688-695. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0637>
- ✓ Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. y Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9 (4), 169-176. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5)
- ✓ Dennery, P.A. (2004). Role of Redox in fetal development and neonatal diseases. *Antioxidants y Redox Signaling*, 6(1), 147-153. <https://doi.org/10.1089/152308604771978453>

- ✓ Dhir, V. y Dhand, P. (2010). Toxicological approach in chronic exposure to lead on reproductive functions in female rats. *Toxicology International*, 17, 1-7. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.68340>
- ✓ Díaz-Acosta, A.E. y Membrillo-Hernández, J. [2006]. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9 (1), 34-44.
- ✓ Díaz-Ruiz, A., Tristán-López, L.A., Medrano-Gómez, K.I., Torres-Domínguez, J.A., Ríos, C. y Montes Sergio. (2017). Glazed clay pottery and lead exposure in Mexico: Current experimental evidence. *Nutritional Neuroscience*, 20 (9), 513-318. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1193967>
- ✓ Doadrio-Villarejo, A.L. (2006). Ecotoxicología y acción toxicológica del plomo. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 72, 409-422.
- ✓ Doumouchtsis, K.K., Doumouchtsis, S.K., Doumouchtsis, E.K. y Perrea, D.N. (2009). The effect of lead intoxication on endocrine functions. *Journal of Endocrinological Investigation*, 32, 175-183. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03345710>
- ✓ Dumitrescu, E., Triff, A., Argherie, D. y Romeo-Teodor, C. (2009). The consequences in utero exposure to lead acetate on exposure and integrity biomarkers of reproductive system in female rats. *Medicina veterinara*, 2, 295- 300.
- ✓ Dumitrescu, E., Cristina, R.T. y Muselin, F. (2014). Reproductive biology study of dynamics of female sexual hormones: a 12-month exposure to lead acetate rat model. *Turkish Journal of Biology*, 38, 581–585. <https://doi.org/10.3906/biy-1402-50>
- ✓ Dumitrescu, E., Chiurciu, V., Florin, M., Popescu, R., Brezovan, D. y Cristina, R.T. (2015). Effects of long-term exposure of female rats to low levels of lead: ovary and uterus histological architecture changes. *Turkish Journal of Biology*, 39, 284-289. <https://doi.org/10.3906/biy-1407-6>
- ✓ Dursun, A., Yurdakok, K., Yalcin, S.S., Tekinalp, G., Aykut, O., Orhan, G. y Morgil, G.K. (2016). Maternal risk factors associated with lead, mercury and cadmium levels in umbilical cord blood, breast milk and newborn hair. *The Journal of Maternal-Fetal y Neonatal Medicine*, 29, 954-961. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1026255>
- ✓ Endo, T., Aten. R.F., Leykin, L. y Behrman, H.R. (1993). Hydrogen peroxide evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology y Metabolism*, 76, 337-342. <https://doi.org/10.1210/jcem.76.2.7679398>

- ✓ Ercal, N., Gurer-Orhan, H. y Burns-Aykin, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part 1: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 529-539. <https://doi.org/10.2174/1568026013394831>
- ✓ Fedorova, M. (2017). Diversity of Protein Carbonylation Pathways. In John Wiley y Sons, Inc (Eds.). *Protein Carbonylation: Principles, Analysis, and Biological Implications*. <https://doi.org/10.1002/9781119374947.ch3>
- ✓ Fitamo, D., Itana, F. y Olsson, M. (2007). Total contents and sequential extraction of heavy metals in soils irrigated with wastewater, Akaki, Ethiopia. *Environmental Management*, 39 (2), 178–193. <https://doi.org/10.1007/s00267-006-0074-4>
- ✓ Flora, G., Gupta, D. y Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5 (2), 47-58. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2>
- ✓ Fortune, J.E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 78, 135–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5)
- ✓ Franks, P.A., Laughlin, N.K., Dierschke, D.J., Bowman, R.E. y Meller, P.A. (1989). Effects of lead luteal function in Rhesus Monkeys. *Biology of Reproduction*, 41, 1055-1062. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.6.1055>
- ✓ Fuentes-Gandara, F., Pinedo-Hernández, J., Marrugo-Negrete, J. y Díez, S. (2016). Human health impacts of exposure to metals through extreme consumption of fish from the Colombian Caribbean Sea. *Environmental Geochemistry and Health*, 40, 229-242. <https://doi.org/10.1007/s10653-016-9896-z>
- ✓ Gadhia, S.R., Calabro, A.R. y Barile, F.A. (2012). Trace metals alter DNA repair and histone modification pathways concurrently in mouse embryonic stem cells. *Toxicology Letters*, 212(2), 169-179. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.05.013>
- ✓ Gulson, B.L., Mizon, K.J., Korsch, M.J., Palmer, J.M. y Donnelly, J.B. (2003). Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation: a summary of long-term research. *Science of the Total Environment*, 303, 79-104. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00355-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00355-8)
- ✓ Gurer, H. y Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*, 29(10), 927-945. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00413-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00413-5)

- ✓ Gurer-Orhan, H., Sabir, H.U. y Ozgunes, H. (2004). Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*, 195(2-3), 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.09.009>
- ✓ Gutiérrez-Salinas, J., García-Ortiz, L., Mondragón-Terán, P., Hernández-Rodríguez, S., Ramírez-García, S. y Núñez-Ramos, N.R. (2016). Determinación de proteínas carboniladas y enzima carbonil reductasa en mujeres mexicanas con cáncer de mama: estudio piloto. *Gaceta médica de México*, 152, 8-13.
- ✓ Hagan, C. (2017). When are mice considered old?. *The Jackson Laboratory*. Consultado el 17/Junio/2019. Link: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old>
- ✓ Halliwell, B. y Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S-725S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>
- ✓ Hansen, K.A., Sandra, P.T., Hanly, M., Moretuzzo, R.W. y McDonough, P. (1997). Massive ovarian enlargement in primary hypothyroidism. *Fertility and Sterility*, 67, 169-171. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)81876-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)81876-6)
- ✓ Haro, M., Taggart, M.A., Lefranc, H., Martín-Doimeadiós, R.C., Green, A.J. y Mateo, R. (2013). Monitoring of Pb Exposure in Waterfowl Ten Years after a Mine Spill through the use of noninvasive sampling. *Plos One*, 8(2), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057295>
- ✓ Hasanein, P., Masumeh, G.V. y Khodadadi, I. (2016). Effects of isoquinoline alkaloid berberine on lipid peroxidation, antioxidant defense system, and liver damage induced by lead acetate in rats. *Redox Report*, 1, 42-50. <https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1140406>
- ✓ Hayashi, K., Miyamoto, A., Konari, A., Ohtani, M. y Fukui, Y. (2003). Effect of local interaction of reactive oxygen species with prostaglandin F<sub>2α</sub> on the release of progesterone in ovine corpora lutea *in vivo*. *Theriogenology*, 59, 1335-1344. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01173-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01173-1)
- ✓ Hernández-Álvarez, D., Mena-Montes, B., Toledo-Pérez, R., Pedraza-Vázquez, G., López-Cervantes, S.P., Morales-Salazar, A., Hernández-Cruz, E., Lazzarini-Lechuga, R., Vázquez-Cárdenas, R.R., Vilchis-DeLaRosa, S., Posadas-Rodríguez, P., Santín-Márquez, R., Rosas-Carrasco, O., Ibañez-Contreras, A., Alarcón-Aguilar, A., López-Díazguerrero, N.E., Luna-López, A. & Köninsberg, M. (2019). Long-Term Moderate Exercise Combined with Metformin Treatment Induces an Hormetic Response That

- Prevents Strength and Muscle Mass Loss in Old Female Wistar Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3428543. <https://doi.org/10.1155/2019/3428543>
- ✓ Hilderbrand, D.C., Der, R., Griffin, W.T. y Fahim, M.S. (1973). Effect of lead acetate on reproduction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 115, 1058–1065. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(73\)90554-1](https://doi.org/10.1016/0002-9378(73)90554-1)
  - ✓ Hirshfield, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124, 43-101. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)
  - ✓ Hobi, M.H. (2014). The Pollution of lead (Pb) in the Soil of Baghdad City after 2003. *International Journal of Engineering and Technical Research*. 3 (4), 201-206.
  - ✓ Hoyer, P.B. (2014). Ovarian toxicology. Editorial CRC Press. 2ª Edición. Nueva York, Estados Unidos. 371pp
  - ✓ Hoyer, P.B. y Keating, A.F. (2014). Xenobiotic effects in the ovary: temporary versus permanent infertility. *Expert Opinion on Drug Metabolism y Toxicology*, 10(4), 511-523. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.880690>
  - ✓ Hsiao-Ling, L., Hsiao-Jui, W., Hsin-Yi, H., Kai-Wei, L. y Ling-Chu, C. (2015). Relationship between risk factors for infertility in women and lead, cadmium and arsenic blood levels: a cross-sectional study from Taiwan. *BMC Public Health*, 15, 1220. <https://doi.org/10.1186/s12889-015-2564-x>
  - ✓ Huh, K., Shin, U.S., Choi, J.W. y Lee, S.I. (1994). Effect of sex hormones on Lipid Peroxidation in Rat Liver. *Archives of Pharmacal Research*, 17, 109-114. <https://doi.org/10.1007/bf02974233>
  - ✓ Hunaiti, A.A y Soud, M. (2000). Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S- transferase, reductase and peroxidase in human blood. *The science of the total environment*, 248, 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00548-3)
  - ✓ Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) (2019). GBD Results Tool. En: GHDx. 2021. Disponible en: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> . Acceso el 18/agosto/2022.
  - ✓ Iqbal, M. P. (2012). Lead pollution: a risk factor for cardiovascular disease in Asian developing countries. *Cardiovascular Diseases Commons*, 25, 289-94.
  - ✓ Jan, M.H., Das, G.K., Singh, J., Khan, S., Kumar, P., Singh, G, Sarkar, M. y Pathak, M. (2015). Oxidative stress during cystic ovarian disease in water buffalo. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85 (4), 356-360.

- ✓ Jangid, A.P., John, P.J., Yadav, D., Mishra, S. y Sharma, P. (2011). Impact of Chronic Lead Exposure on Selected Biological Markers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 27, 83-89. <http://doi.org/10.1007/s12291-011-0163-x>
- ✓ Jarvis, P., Quay, K., Macadam, J., Edwards, M. y Smith, M. (2018). Intake of lead (Pb) from tap water of homes with leaded and low lead plumbing systems. *Science of the Total Environment*, 644(10), 1346-1356. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.064>
- ✓ Jasim-Sodani, I. (2017). Study the adverse effects of exposure to lead acetate on mice ovarian tissue. *International Journal of Advanced Research*, 5 (5), 727-735.
- ✓ Jentsch, A.M., Bachman, H., Fürst, P. & Biesalski, H.K. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(2), 251-256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- ✓ Jomova, K. y Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- ✓ Jooste, P.J. y Anelich, E.C.M. (2008). Safety and quality of dairy products. In *Advanced Dairy Science and Technology*, eds. T. Britz and R. K. Robinson, pp. 153–78. (Oxford, U.K.: Blackwell Publishing Ltd). <https://doi.org/10.1002/9780470697634.ch5>
- ✓ Junaid, M., Chowdhuri, D.K., Narayan, R., Shanker, R. y Saxena, D.K. (2010). Lead induced changes in ovarian follicular development and maturation in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 50, 31-40. <https://doi.org/10.1080/009841097160582>
- ✓ Kandasamy, S., Sivagamusandri, R., I., Bupathy, A., Setubathy, S. y Global, V. (2010). Evaluation of insulin resistance and oxidative stress in ovese patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 25(8), 504-507. <https://doi.org/10.1080/09513590902972083>
- ✓ Kasperczyk, A., Slowinska-Lozynska, L., Kasperczyk, A., Wielkoszynski, T. y Birkner, E. (2012). The effect of occupational lead exposure on lipid peroxidation, protein carbonylation, and plasma viscosity. *Toxicology and Industrial Health*, 31 (12), 1165-1171. <https://doi.org/10.1177/0748233713491804>
- ✓ Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Ostalowska, A., Kasperczyk, A., Wilczynski, S., Wyparlo-Wszelaki, M., Kieltucki, J. y Birkner, E. (2013). Lead-elevated activity of xanthine oxidase in lead-exposed workers. *Medycyna Pracy*, 64(2), 175,180. <http://dx.doi.org/10.13075/mp.5893/2013/0013>

- ✓ Kierszenbaum, A.L. (2007). *Histology and Cell Biology: an Introduction to Pathology*. Mosby Elsevier. 2nd Edition. Canada. 671pp.
- ✓ Kirberger, M., Wong, H.C., Jiang, J. y Yang, Y. (2013). Metal toxicity and opportunistic binding of Pb<sup>2+</sup> in proteins. *Journal of Inorganic Chemistry*, 1, 1-44. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.04.002>
- ✓ Komura, Y.K. (1986). Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation. *Biochemistry International*, 13(6), 1051-1055.
- ✓ Krieg, E. y Feng, H. (2011). The relationships between blood lead levels and serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Reproductive Toxicology*, 32, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.05.012>
- ✓ Kumar, S. (2018). Occupational and Environmental Exposure to Lead and Reproductive Health Impairment: An Overview. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 22, 128–137.
- ✓ Lalwani, N., Patel, S., Ha, K.Y., Shanbhogue, A.K., Nagar, A.M., Chintapalli, K.N y Prasad, S.R. (2011). Miscellaneous tumour-like lesions of the ovary: cross-sectional imaging review. *The British Institute of Radiology*, 85, 1013. <https://doi.org/10.1259/bjr/92819127>
- ✓ Lefevre B. (2001). Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reproductive Toxicology*, 15, 385-439. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(01\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00139-3)
- ✓ Liu, Y., Huo, X., Xu, L., Wei, X., Wu, W., Wu, X. y Xu. (2017). Hearing loss in children with e-waste lead and cadmium exposure. *Science of the Total Environment*, 624, 621-627. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.091>
- ✓ Li, K., Lizka, M., Zhou, C., Brehm, E., Flaws, J.A., y Nowak, R.A. (2020). Prenatal exposure to a phthalate mixture leads to multigenerational and transgenerational effects on uterine morphology and function in mice. *Reproductive Toxicology*, 93, 178-190. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.02.012>
- ✓ Liu, Y., Téllez-Rojo, M.M., Sánchez, B.N., Zhang, Z., Afeiche, M.C., Mercado-García, A., Hu, H., Meeker, J.D. y Peterson, K.E. (2019). Early lead exposure and pubertal development in a Mexico City population. *Environment International*, 125, 445-451. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030427>
- ✓ Lukacinova, A., Benacka, R., Sedlakova, E., Lovasova, E. & Nistiár, F. (2012). Multigenerational lifetime low-dose exposure to heavy metals on selected reproductive parameters in rats. *Journal of*



*Environmental Science and Health*, Part A, 47 (9): 1280-1287.  
<https://doi.org/10.1080/10934529.2012.672132>

- ✓ Luo, J., Meng, J., Ye, Y., Wang, Y. y Bai, L. (2016). Population health risk via dietary exposure to trace elements (Cu, Zn, Pb, Cd, Hg, and As) in Qiqihar, Northeastern China. *Environmental Geochemistry and Health*, 40, 217-227. <https://doi.org/10.1007/s10653-016-9895-0>
- ✓ Ma, Y., Shi, Y.X., Wu, Q.J., Wang, Y.Q., Wang, J.P. y Liu, Z.H. (2020). Effects of varying dietary intoxication with lead on the performance and ovaries of laying hens. *Poultry Science*, 99 (9), 4505-4513. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.015>
- ✓ Mah, V. y Jalilehvand, F. (2013). Lead (II) Complex Formation with Glutathione. *Inorganic Chemistry*, 51 (11), 6285-6298. <https://doi.org/10.1021/ic300496t>
- ✓ Maloney B., Bayon B.L., Zaqia H.N. y Lahiri, D.L. (2018). Latent consequences of early-life lead (Pb) exposure and the future: Addressing the Pb Crisis. *Neurotoxicology*, 68, 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.06.016>
- ✓ Margolin, T., Aten, R.F. y Behrman, H.R. (1990). Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 127, 245-250. <https://doi.org/10.1210/endo-127-1-245>
- ✓ Markowitz, M. (2000). Lead poisoning. *Pediatrics in Review*, 21(10), 327-335. <https://doi.org/10.1542/pir.21.10.327>
- ✓ Masudul-Hoque, M.S.A., Umehara, T., Kawai, T. y Shimada, M. (2021). Adverse effect of superoxide-induced mitochondrial damage in granulosa cells on follicular development in mouse ovaries. *Free radical biology and Medicine*, 163, 344-355. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.434>
- ✓ McNeilly, A.S., Crawford, J.L., Taragnat, C., Nicol, L. y McNeilly, J.R. (2003). The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback, and packaging. *Reproduction Supplement*, 61, 463-476. <http://dx.doi.org/10.1530/biosciprocs.5.034>
- ✓ Mesquita, C.S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. y Marcos, J.C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 458, 69-71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>
- ✓ Morales, N.A., Martínez, D., García-Meza, J.V., Labastida, I., Armienta M.A., Razo, I. y Lara, R.H. (2015). Total and bioaccessible arsenic and lead in soils impacted by mining exploitation of Fe-oxide-

- rich ore deposit at Cerro de Mercado, Durango, México. *Environmental Earth Sciences*, 73, 3249-3261. <http://dx.doi.org/10.1007/s12665-014-3617-7>
- ✓ Musicki, B., Aten, R.F. y Behrman, H.R. (1994). Inhibition of protein synthesis and hormone sensitive steroidogenesis in response to hydrogen peroxide in rat luteal cells. *Endocrinology*, 134, 588-195. <https://doi.org/10.1210/endo.134.2.7507829>
  - ✓ Nampoothiri, L.P. y Gupta, S. (2005). Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: A cellular model for ovarian toxicity. *Reproductive Toxicology*, 21, 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.07.010>
  - ✓ Nampoothiri, L.P., Agarwal, A. y Gupta, S. (2007). Effect of coexposure to lead and cadmium on antioxidant status in rat ovarian granulose cells. *Archives of Toxicology*, 81, 145–150. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0133-x>
  - ✓ Nampoothiri, L.P. y Gupta, S. (2008). Biochemical Effects of Gestational Coexposure to Lead and Cadmium on reproductive performance, placenta, and ovary. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22(5), 337-344. <https://doi.org/10.1002/jbt.20246>
  - ✓ Nazarpour, A., Watts, M.J., Madhani, A. y Elahi, S. (2019). Source, spatial distribution, and pollution assessment of Pb, Zn, and Pb isotopes in urban soils of Ahvaz City, a semi-arid metropolis in southwest Iran. *Scientific Reports*, 9, 5349-5359. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41787-w>
  - ✓ Neupane, K.P., y Pecoraro, V.L. (2011). Pb-207 NMR spectroscopy reveals that Pb(II) coordinates with glutathione (GSH) and tris cysteine zinc finger proteins in a PbS3 coordination environment. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1030-1034. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.04.010>
  - ✓ Ngole-Jeme, V.M., Ekosse, G.I. y Songca, S.P. (2018). An analysis of human exposure to trace elements from deliberate soil ingestion and associated health risks. *Journal of Exposure Science y Environmental Epidemiology*, 28, 55-63. <https://doi.org/10.1038/jes.2016.67>
  - ✓ NOM-127-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación. México. 1994.
  - ✓ NOM-199-SSA1-2000. Diario Oficial de la Federación. México. 2000.
  - ✓ Oben-Gyasi, E. (2019). Sources of lead exposure in various countries. *Reviews on Environmental Health*, 34(1), 25-34. <https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0037>
  - ✓ Ospina, I.D. (2015). Ficha Técnica: Acetato de plomo Tri Hidratado. Distribuidora de Químicos Industriales. 5pp: <https://dqisa.com/wp-content/uploads/2015/10/ACETATO-DE-PLOMO.pdf>  
[revisado el 08/Febrero/2020](#)

- ✓ Panwar, K., Sharma, R., Mogra, S., Qureshi, N. y Barber, I. (2011). Effect of lead exposure during gestation and lactation on developing ovary in Swiss mice. *The Asian Journal of Animal Science*, 6(1), 14-20.
- ✓ Patrick, L. (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*, 11(2), 114-127.
- ✓ Peakall, D. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News*, 1, 55-60.
- ✓ Pelfrene, A. y Douay, F. (2017). Assessment of oral and lung bioaccessibility of Cd and Pb from smelter-impacted dust. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(4), 3718-3730. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0760-1>
- ✓ Prophet E. B. Armed Forces Institute of Pathology (Estats Units d'Amèrica) & American Registry of Pathology. (1995). *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology.
- ✓ Puzigaic, Z., Prelevic, G.M., Stretenovic, Z. y Balint-peric, L. (2009). Ovarian enlargement as a possible marker for androgen activity in polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 5(3), 167-174. <http://dx.doi.org/10.3109/09513599109028438>
- ✓ Quintanar-Escorza, M.A., González-Martínez, M.T., Intrigao-Ortega, M.P. y Calderón Salinas, J.V. (2010). Oxidative damage increases intracellular free calcium  $[Ca^{2+}]_i$  concentration in human erythrocytes incubated with lead. *Toxicology In Vitro*, 24 (5), 1338-1346. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.002>
- ✓ Qureshi, N., Sharma, R. y Mogra, S. (2010). The microscopically examination of the ovary reveals that there was apparent damage and reduction in number of primordial follicles while number of atretic follicles increases markedly. *Asian Journal of Environmental Sciences*, 5, 44-48.
- ✓ Qureshi, N. y Sharma, R. (2012). Lead toxicity and infertility in female Swiss mice: A review. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 2 (4), 1849-61.
- ✓ Rabanni-Chadegani, A., Abdosamadi, S., Fani, N. y Mohammadian, S. A. (2009). Comparison of the effect of lead nitrate on rat liver chromatin, DNA and histone proteins in solution. *Archives of Toxicology*, 83 (6), 565-570. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0362-2>
- ✓ Rahman, M.S., Pang, W.K., Ryu, D.Y., Park, Y.J., Ryu, B.Y. & Pang, M.G. (2021). Multigenerational impacts of gestational bisphenol A exposure on the sperm function and fertility of male mice. *Journal of Hazardous Materials*, 416 (15), 125791. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125791>

- ✓ Ray, P.D., Huang, B.W. y Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signaling*, 24, 981-990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- ✓ Razi, S., Kazmi, H. y Can, A.S. (2021). Luteinizing Hormone Deficiency. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562219/>
- ✓ Resongles, E., Dietze, V., Green, D.C. y Weiss, D.J. (2021). Strong evidence for the continued contribution of lead deposited during the 20th century to the atmospheric environment in London of today. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 18 (26), e2102791118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102791118>
- ✓ Reczek, C.R. y Chandel, N.S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.010>
- ✓ Richards, J.S. y Pangas, S.A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *Journal of Clinical Investigation*, 120 (4), 963-972. <http://doi.org/10.1172/JCI41350>
- ✓ Rocha-Silva, J.P., Junqueira-Salles, F., Nogueira-Leroux, I., Silva-Ferreira, A.P.S., Soares da Silva, A., Antonio-Assuncao, N., Cassia-Nardocci, A., Sayuri-Sato, A.P., Barbosa Jr., F., Alves-Cardoso, M.R. y Kaneshiro-Olympio, K.P. (2018). High blood lead levels are associated with lead concentrations in household and day care centers attended by Brazilian preschool children. *Environmental Pollution*, 239, 681-688. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.080>
- ✓ Roche, E., y Romero-Alvira, D. (1997). Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo: Sistemas de defensa y reparación. En: Romero-Alvira, D., Roche, E.: *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular: Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología*. ENE Ediciones, 105-123.
- ✓ Ronis, M.J.J., Badger, T.M., Shema, S.J., Roberson, P.K. y Shaik, F. (1996). Reproductive Toxicity and Growth Effects in Rats Exposed to Lead at Different Periods during Development. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 136 (2), 361-371. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0044>
- ✓ Roy S. y Edwards, M.A. (2019). Preventing another lead (Pb) in drinking water crisis: Lessons from the Washington D.C. and Flint MI contamination Events. *Current Opinion in Environmental Science y Health*, 7, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.10.002>
- ✓ Salcedo, D., Castro, T., Bernal, L.P., Almanza-Veloz, V., Zavala, M., González-Castillo, E., Saavedra, M.I., Perez-Arvizu, O., Díaz-Trujillo, G.C. y Molina, L.T. (2016). Using trace element content and lead

- isotopic composition to assess sources of PM in Tijuana, Mexico. *Atmospheric Environment*. 132, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.02.041>
- ✓ Salim-Hammed, M., Arrak, J.K., Al-Khafaji, N.J. y Hassan, A.A. (2014). Effect of date palm pollen suspension on ovarian function and fertility in adult female rats exposed to Lead Acetate. *Diyala Journal of Medicine*, 3 (1), 90-96.
  - ✓ Schell, L. M., Burnitz, K. K. y Lathrop, P. W. (2010). Pollution and human biology. *Annals of Human Biology*, 37, 347–366. <https://doi.org/10.3109/03014461003705511>
  - ✓ Sen, A., Heredia, N., Senut, M.C., Land, S., Hollocher, K., Lu, X., Dereski, M.O. & Ruden, D.M. (2015). Multigenerational epigenetic inheritance in humans: DNA methylation changes associated with maternal exposure to lead can be transmitted to the grandchildren. *Nature Scientific Reports*, 5: 14466. <https://doi.org/10.1038/srep14466>
  - ✓ Shah, A.S., Shariff, M.M., Khan, S.A., Tayyab, M., Chaudary, N.A. y Ahmed, N. (2008). Correlation of blood lead levels with atresia of ovarian follicles of albino mice. *Annals of Pakistan Institute of Medical Sciences*, 4, 188–192.
  - ✓ Shafiq-ur-Rehman (2013). Effect of Lead on Lipid Peroxidation, Phospholipids Composition, and Methylation in Erythrocyte of Human. *Biological Trace Element Research*, 154 (3), 433-439.
  - ✓ Sharma, R., Garu, U. y Panwar, K. (2012a). Developing Gonads and Lead Exposure. *World Journal of Environmental Biosciences*, 1, 30-37.
  - ✓ Sharma, R., Qureshi, N., Mogra, S. y Panwar, K. (2012b). Lead induced infertility in Swiss Mice and Role of Antioxidants. *International Journal of Environmental Research*, 2 (2), 72-82. <https://doi.org/10.3402/ijm.v5i0.4621>
  - ✓ Sharma, D.N. y Bhattacharya, L. (2014). Effects of maternal lead acetate exposure during lactation on postnatal development of ovaries in offspring of swiss albino mice. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 4 (2), 419-424.
  - ✓ Shirota, M., Soda, S., Katoh, C., Asai, S., Sato, M., Ohta, R., Watanabe, G., Taya, K. y Shirota, K. (2003). Effects of reduction of the number of primordial follicles on follicular development to achieve puberty in female rats. *Reproduction*, 125, 85-94. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250085>
  - ✓ Sobolewski, M., Abston, K., Conrad, Marvin, E., Harvey, K., Susiarjo, M. & Cory-Slechta, D.A. (2020). Lineage- and Sex-dependent behavioral and biochemical transgenerational consequences of developmental exposure to lead, prenatal stress and combined lead and prenatal stress in mice.

*Environmental Health Perspectives*, 128 (2), 027001. <https://doi.org/10.1289/EHP4977>

- ✓ Stephen, F. (1995). Polycystic Ovary Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 333 (13), 853-861. <https://doi.org/10.1056/nejm199509283331307>
- ✓ Sugino, N. (2005). Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive Medicine and Biology*, 4, 31-44. <https://doi.org/10.1007/bf03016135>
- ✓ Suzuki, Y.J., Carini, M. y Butterfield, D.A. (2010). Protein Carbonylation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 12 (3), 323-325. <https://dx.doi.org/10.1089%2Fars.2009.2887>
- ✓ Taggart, M.A., Figuerola, J., Green, A.J., Mateo, R., Deacon C., Osborn, D. y Meharg, A.A. (2006). After the Aznalcóllar mine spill: Arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of five waterfowl species. *Environmental Research*, 100, 349-361. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.07.009>
- ✓ Tamayo y Ortiz, M., Téllez-Rojo, M.M., Hu, H., Hernández-Ávila, M., Wright, R., Amarisiriwardena, C., Lupoli, N., Mercado-García, A., Pantic, I. y Lamadrid-Figueroa, H. (2016). Lead in Candy consumed and blood lead levels of children living in Mexico City. *Environmental Research*, 147, 497-502. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.03.007>
- ✓ Taupeau, C., Poupon, J., Nome, F. y Lefevre, B. (2001). Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-infuced follicular atresia. *Reproductive Toxicology*, 15(4), 385-291. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\[01\]00139-3](https://doi.org/10.1016/s0890-6238[01]00139-3)
- ✓ Taupeau, C., Poupon, J., Treton, D., Brosse, A., Richard, Y. y Machelon, V. (2003). Lead reduces messenger RNA and protein levels of cytochrome p450 aromatase and estrogen receptor B in human ovarian granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 68, 1982-1988. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.009894>
- ✓ Titus, S., Li, F., Stobezki, R., Akula, K., Unsal, E., Jeong, K., Moy, F., Goswami, K. y Oktay, K. (2013). Impairment of BRCA1-Related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Science Translational Medicine*, 5 (72), 2-25. <https://dx.doi.org/10.1126%2Fscitranslmed.3004925>
- ✓ Trojnar, E.L., Drag-Kozak, E., Szczerbik, P., Socha, M. y Popek, W. (2014). Effect of long-term dietary lead exposure on some maturation and reproductive parameters of a female Prussian carp (*Carassius*

gibelio B.) *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 2465-2478.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-013-2184-x>

- ✓ Trujillo-Vázquez, S.K., Bonilla-González, E., Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcon, J., López-Duran, R.M. y Gómez-Olivares, J.L. (2021). Exposición al plomo: Conocimientos sobre los efectos en ovarios y el impacto a la salud reproductiva femenina. *TIP-Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24, 1-13. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.366>
- ✓ Valdivia-Infantas, M.M. (2005). Intoxicación por plomo. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 18(1), 22-27.
- ✓ Vedder, H., Anthes, N., Stumm, G., Würz, C., Behl, C. y Krieg, J.C. (1999). Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), 2531-2538. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0722531.x>
- ✓ Vermande-Van Eck, Gertrude, J. y Wister Meigs, J. (1960). Changes in the ovary of the Rhesus monkey after chronic lead intoxication. *Fertility and Sterility*, 11, 223-34. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)33730-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)33730-x)
- ✓ Wang, Y., Yang, J., y Yi., J. (2012). Redox sensing by proteins: Oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxidants y redox signaling*, 16(7), 649-657. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4313>
- ✓ Waseem, N., Butt, S.A. y Hamid, S. (2014). Amelioration of lead induced changes in ovary of mice, by garlic extract. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 64, 798–801.
- ✓ Wiebold, J.L. y Becker, W.C. (1987). Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*, 79, 125-134. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0790125>
- ✓ Wilson, C.A. y Leigh, A.J. (1992). Endocrine toxicology of the female reproductive system. En “Endocrine Toxicology”, C.K. Atterwill and J.D. Flack, eds., pp. 313-395. Cambridge University Press, Oxford, Inglaterra.
- ✓ Winiarska-Mieczan, A. y Kwiecien, M. (2016). The effect of exposure to Cd and Pb in the form of a drinking water or feed on the accumulation and distribution of these metals in the organs of growing Wistar rats. *Biological Trace Element Research*, 169, 230-236. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0414-4>

- ✓ Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z. y Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (9), 8244-8259. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>
- ✓ Xu, J., Lian, L.J., Wu, C., Wang, X., Fu, W. y Xu, L. (2007). Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1488-1494. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.12.016>
- ✓ Zhao, G., Cardenas, H. y Matei, D. (2019). Ovarian Cancer-Why Lipids Matter. *Cancers*, 11(12), 1870. <https://doi.org/10.3390/cancers11121870>
- ✓ Zarkovic, N. (2020). Roles and functions of ROS and RNS in cellular physiology and pathology. *Cells*, 9(3), 767. <https://doi.org/10.3390/cells9030767>
- ✓ Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y. y Dong, W. (2015). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>





## Oxidative stress in the ovaries of mice chronically exposed to a low lead concentration: A generational approach

S.K. Trujillo-Vázquez<sup>a,\*</sup>, S. Gaona-Domínguez<sup>b</sup>, J.D. Villeda-González<sup>c</sup>, R. Librado-Osorio<sup>d</sup>, A. Luna-López<sup>d</sup>, E. Bonilla-González<sup>e</sup>, P.R. Valencia-Quintana<sup>f</sup>, J.L. Gómez-Olivares<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, México

<sup>b</sup> Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Campus sur, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Investigación Básica, Instituto Nacional de Geriátrica, Mexico City, Mexico

<sup>e</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

<sup>f</sup> Laboratorio "Rafael Villalobos Petrini" de Toxicología Genética y Química Ambiental, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

### ARTICLE INFO

Handling Editor: Bal-Price Anna

#### Keywords:

Lead acetate  
Ovary  
Mice  
Toxicity  
Low concentration  
Generational exposure  
Histology  
Oxidative stress

### ABSTRACT

Lead (Pb) is a heavy metal that alters the oxidation-reduction balance, affecting reproductive health and transfer during pregnancy and lactation. However, the multigenerational impact of exposure to low concentrations of Pb on mammalian ovaries has not been assessed. This study evaluated general parameters, histology, redox state (RS), protein carbonylation (PC), lipid peroxidation (LP), and hormone concentrations in the ovaries of mice (CD1@ ICR) of three successive generations with both unigenerational (E1) and multigenerational (E2) exposure to 0.2 ppm lead acetate through the drinking water and a control group. Body weight, food consumption, the number of born pups, and their weight after weaning were not significantly affected by Pb exposure in E1 and E2. However, the ovaries of three successive generations of the E1 group, in which only the F0 was exposed, showed alterations in the ovarian histoarchitecture, increase in follicular atresia, decrease in the number of available follicles, and a significant RS and PC elevation that were surprisingly similar to those observed in the E2 group. LP increased in the second generation of E1 and E2, while hormone concentration was not altered. This is the first demonstration that exposure to low concentration of Pb induces multigenerational histological alterations and oxidative stress in mouse ovaries, that the termination of this exposure does not ensure the safety of later generations and that the lack of modifications in general parameters may facilitate the silent development of pathologies that affect ovarian health.

### 1. Introduction

Lead (Pb) is a heavy metal that is regulated by government agencies to protect the population and the environment from its toxic effects [1, 2]. However, due to the historical exploitation and its environmental persistence, Pb concentrations are still present in some living organisms. Its toxic threshold is difficult to define due to its physicochemical variations, its behavior, and its interactions with other elements in the atmosphere, the hydrosphere, sediment and soil, groundwater, and biota [3]. In addition, the differences in responses within and among species limit the use of strategies for monitoring Pb concentrations in organisms

[1,3].

Most cases of human Pb exposure result from the use of gasoline additives, Pb-based paints, ceramic glazes, and poorly managed drinking water systems [3]. Moreover, parameters such as water chemistry, pH, and temperature influence the availability of Pb in different regions of the world, facilitating its ubiquitous presence in many countries and leading to frequent non-occupational exposure to Pb. In addition, Pb exposure is estimated to account for an annual worldwide loss of 21.7 million years of human life due to disability and death because of its long-term effects on the population's health, according to the World Health Organization [4–8].

**Abbreviations:** Pb-Lead, PbA-Lead acetate; OS-Oxidative Stress, ROS-Reactive Oxygen Species; F0-First generation, F1-Second generation; F2-Third generation, RS- Redox state, PC-Protein Carbonylation LP-Lipid Peroxidation.

\* Correspondence to: Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco, Núm. 186, Col. Leyes de Reforma 1 A Sección, Iztapalapa, C.P. 09310 Ciudad de México, Mexico.

E-mail address: [nauyaca@outlook.com](mailto:nauyaca@outlook.com) (S.K. Trujillo-Vázquez).

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.12.001>

Received 6 August 2022; Received in revised form 29 November 2022; Accepted 2 December 2022

Available online 5 December 2022

0890-6238/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

Pb can access the body through various routes, the most common being the gastrointestinal tract through oral ingestion [3]. Once inside the organism, Pb is distributed to various body compartments and tissues: blood, brain, and liver suffer the most notorious and studied effects of this metal, while bone is known as a repository where this metal will accumulate over a period of many years [1,9,10]. Pb is present in cells in an ionic form that is particularly attracted to sulfhydryl groups and to protein components while competing with essential metals such as calcium that are intimately related to the body's oxidation-reduction balance (redox state) and to various metabolic pathways [3,11,12]. As a result, a cascade of Pb toxicity may ensue because these interactions do not function correctly, decreasing enzyme activity and resulting in fewer available antioxidants and in the accumulation of reactive oxygen species (ROS) formed during normal cellular processes, ultimately resulting in oxidative stress (OS) [11,13,14].

Female fertility depends greatly on the ovaries, which play a central role in sexual maturation and in the generation and development of oocytes [14]. ROS are formed during steroidogenesis, follicular maturation, resumption of meiosis, and ovulation [15]. However, excessive ROS in the ovaries promote many pathological processes [15]. Hence, antioxidant enzymes and molecules such as glutathione (GSH) are pivotal in maintaining the redox balance and thereby ensuring ovarian homeostasis [15]. Unfortunately, exposure even to low concentrations of Pb promotes OS by causing an imbalance in this relationship [16–18], facilitating ROS-related cellular damage, apoptosis, necrosis, and resumption of meiosis, altering the ovarian histoarchitecture, and affecting female reproductive health in both the short and long terms [16,19–21].

Moreover, the calcium mobilization that occurs during gestation and lactation releases the Pb stored in the female osseous system, posing a risk factor to the health of both the mother and the fetus, even when they are no longer environmentally exposed to Pb [2,22]. Therefore, the deleterious effects of Pb exposure concern not only the exposed female's reproductive health but also the health of the next generation. Augmented follicular atresia, resumption of meiosis, necrosis, hormonal imbalances, decreased number of primordial follicles, and increased number of atretic follicles are some of the most often reported ROS-related alterations in the offspring of females exposed to this metal during pregnancy or lactation [19,23–26]. However, the cited reports focus on uninterrupted treatments exposure of pregnant females and their fetuses or weanlings to high concentrations of Pb, leaving unanswered questions about the possible effects of Pb exposure on the offspring and on their descendants during adulthood.

Studies on the effect of Pb exposure on males in one and two-generational models with uninterrupted treatment have reported that this heavy metal accumulates in the gonads of both the mother and the fetus to a degree that is directly correlated with the concentration used [27–29]. Some of the most severe changes observed are the destruction of gonad parenchyma, vascular congestion, necrosis, hormonal imbalance, and short or long-term sterility [24,25]. Nevertheless, exposure to this metal does not necessarily impact gonads in the same way in each generation; thus, the lack of noticeable alterations in one generation does not ensure the safety of the exposed animals' offspring and their descendants [27–29].

In addition, some females that have been exposed to Pb retain the ability to procreate later in life, and because Pb can be transferred to the fetus and to lactating offspring, it can affect the ovarian and reproductive health of the descendants despite a lack of exposure to environmental Pb during their development [2]. Moreover, research on the effects of other xenobiotics such as phthalate mixtures and bisphenol A (BPA) has shown that similar ovarian alterations are observable in up to four successive generations after termination of exposure to these xenobiotics [30,31]. This emphasizes the importance of expanding our knowledge about Pb's toxicity to the female reproductive system and its generational impact.

Although extensive research has been conducted on the effects of Pb

exposure on ovaries, there are no published studies on the effects of exposure to low concentrations of this metal on mammalian ovarian histoarchitecture, or on OS biomarkers in three successive generations. In addition, Pb storage in bone, liberation, and transfer from the mother to the offspring point to potential damage to the ovarian structures of unexposed generations. Thus, this study analyzes the effects of unigenerational and multigenerational exposure to a low concentration of Pb and its capacity to alter OS biomarkers, hormone levels, and ovarian histology in three successive generations of female mice.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

Pb was purchased from Sigma-Aldrich in the form of lead acetate [PbA/ Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>] (Product number 32306, CAS registry number 51404–69–4). The PbA was diluted in tap water filtered by the vivarium to obtain a 0.2 ppm suspension. Pb was administered through the animals' drinking water, which was provided ad libitum [5]. The concentration was selected based on the concentration standard used in drinking water (1 ppm) in previous experimental reports [19,21].

### 2.2. Animals

Female CD1 mice (CrI: CD1 [ICR]) were provided by the Metropolitan Autonomous University (UAM) animal care facility immediately after weaning of the animals (22 days old). The mice were housed in acrylic cages at 21 °C with a 12 h/12 h photoperiod and fed a balanced commercial diet (Nupec, Mexico). The vivarium provided drinking water. Food and water were available ad libitum to the animals in all groups. The animals were weighed, and their average food and water consumption was measured three times weekly by comparing the amount of water and feed provided at the beginning of the week with the amount of water and feed remaining at the end of the week. During the last week of the treatment, the estrous cycle was followed through analysis of vaginal smear to ensure that all organisms were in diestrus [32] when euthanized.

The experimental design and animal management protocols used in this study were approved by the Bioethics Committee for Animal Experiments of the Metropolitan Autonomous University (UAM) and conformed to the Official Mexican Standard for the Care and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999), which is based on the U.S. National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023).

### 2.3. Treatment

Eighteen 22-day-old, healthy, unexposed female mice were selected. The F0 generation had a total of 18 female mice. Six organisms of the mice were assigned to the control group, and 12 organisms were given drinking water containing 0.2 ppm PbA until they were 75 days of age. At this time, the animals were mated with unexposed male mice of proven fertility. After mating, six mice (group E1) no longer received the treatment, but instead were allowed to ingest the same clean water as the control group (C); the remaining six mice (group E2) in the experimental group continued to receive the treatment throughout pregnancy and lactation. The 65 pups born to the F0 dams were considered the F1 generation. The F1 generation pups born to the mice in Group E1 were never exposed to PbA, while the F1 generation pups born to the mice in Group E2 were exposed to PbA (through their mothers) from conception until they were euthanized. At 75 days of age, F1 females were mated to unexposed fertile adult males to generate an F2 generation. The 69 mice in the F2 generation received the same treatment as their counterparts in the F1 generation.

#### 2.4. Ovaries and blood sampling

At 4 ½ months (135 days) of age, F0, F1, and F2 mice were weighed and euthanized while in diestrus (the stage of the estrus cycle was confirmed by vaginal smear) [32]. The animals' ovaries were collected, weighed, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis, and blood was collected via cardiac puncture and used to evaluate hormone levels.

Ovaries were chosen randomly from among individuals of each group and analyzed for OS biomarkers. The right ovaries of at least 3 individuals per group per generation were subjected to histological analysis.

#### 2.5. Follicle count and histological analysis

The animals' right ovaries were dissected and fixed in 4% formalin and PBS in aqueous solution for 48 h. We based our methodology on the manual prepared by the Armed Forces of the United States of America. The samples were processed by washing, dehydration with ethanol, clarification, and embedding of the ovaries in paraffin. Sections of 3  $\mu\text{m}$  in thickness were cut and stained with hematoxylin-eosin (HE) according to the method described by Prophet & Mills' [33]. Observations were made with an Olympus BX41™ microscope at 100X magnification, and the images were captured using an Evolution Pro® video camera. Image processing was performed in ImagePro V. 6.0e. The follicle count was performed manually using a single section per individual taken from near the central-medullary zone of the ovary; the presence of precipitates in some samples influenced the counting results.

#### 2.6. Redox state (RS) (GSH/GSSG ratio)

The content of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) in the ovaries of 4 ½ months-old mice was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to the protocol described by Hernández-Álvarez [34] with some modifications. First, 200 mg of ovarian tissue was homogenized in 800  $\mu\text{L}$  lysis buffer (10% hydrochloric acid/1 mM bathophenanthroline disulfonate, BPDS). The homogenate was centrifuged at 5000g for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was recovered, and 50  $\mu\text{L}$  of the sample was injected into the HPLC system. The analysis was conducted using a Waters 1525 Binary HPLC Pump (Waters, Miami, FL, USA) coupled to a 2489 UV/visible detector calibrated at 210 nm. The stationary phase was a 4:6  $\times$  250 mm Zorbax Eclipse XDB-C18 column with a particle size of 5  $\mu\text{m}$ , and 1% acetonitrile/99% of monobasic potassium phosphate buffer (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) at pH 2.7 was used as the mobile phase. The flow rate from min 0 to min 5 was 1 mL/min (1% acetonitrile/99% phosphate buffer), from min 5 to min 8 it was 1.1 mL/min (10% acetonitrile/90% phosphate buffer), and from min 8 to min 10 it was 1 mL/min (1% acetonitrile/99% phosphate buffer). GSH and GSSG were detected at 210 nm using a Waters™ 2489 UV/Vis dual-wavelength absorbance detector. Glutathione calibration curves were prepared using GSH and GSSG standards (5, 10, 25, 50, 100, 200, and 400  $\mu\text{M}$ ).

#### 2.7. Protein carbonylation (PC)

A modification of the method described by Mesquita et al. [35] was used to determine the presence of carbonylated proteins. First, 400  $\mu\text{L}$  of ovarian homogenate was added to 400  $\mu\text{L}$  of DNPH (10 mM in 0.5 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). After 10 min of incubation, 200  $\mu\text{L}$  of 6 M NaOH was added, and the sample was mixed and incubated for 15 min in the dark at room temperature. After the addition of 250  $\mu\text{L}$  of trichloroacetic acid (50% w/v), the mixture was vortexed. The mixture was then incubated at  $20^{\circ}\text{C}$  for at least 15 min before centrifugation at 23,640 g for 5 min. Following centrifugation, the supernatant was discarded without disturbing the pellet, and the pellet was washed three times with 1 mL of ethanol/ethyl acetate (1/1; v/v) to remove free DNPH reagent. At each washing step, the pellet was allowed to stand for 10 min after addition of

the washing solvent, and the mixture was then centrifuged at 23,640g for 5 min. The resulting pellet was resuspended in 1.0 mL of 6 M guanidine-HCl. An equal volume of buffer solution was used as a blank. The absorbance of the resulting solution was read at 450 nm after incubation for 10 min in a Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher).

#### 2.8. Lipid peroxidation (LP)

To determine LP levels, thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) present in aliquots of ovarian homogenates (0.1 M PBS, pH 7.5) were evaluated using a spectrophotometric technique [36]. The basis of this method is the reaction between thiobarbituric acid (TBA) and the lipid peroxidation product malondialdehyde, which produces TBARS. Briefly, 10% trichloroacetic acid was added to each serum aliquot and to a sample of each ovary homogenate; the mixtures were maintained on ice and then centrifuged at 23,314g and  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Next, TBA was added to the supernatants, and the sample was shaken vigorously, incubated at  $100^{\circ}\text{C}$  for 60 min, cooled to room temperature, mixed again, and centrifuged, followed by reading of the absorbance at 535 nm in a Multiskan™ spectrophotometer (Thermo Fisher). A reference standard of 1,1,3,3-tetramethoxypropane was prepared.

#### 2.9. Hormonal analysis

The levels of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in serum were measured by DRG® FSH-serum and LH-serum ELISA kits. A standard curve was used in each case. For this assay, 25  $\mu\text{L}$  each of standards, controls, and samples were added to microplate wells using new disposable tips. Then, 100  $\mu\text{L}$  of enzyme conjugate was dispensed into each well and thoroughly mixed for 10 s. The plate was incubated for 30 min at room temperature. The contents of the wells were shaken, the wells were rinsed five times with distilled water (400  $\mu\text{L}$  per well), and the plate was struck sharply on absorbent paper to remove residual droplets. Then, 100  $\mu\text{L}$  of the substrate solution was added, and the plate was incubated for 10 min at room temperature. The enzymatic reaction was stopped by addition of 50  $\mu\text{L}$  stop solution to each well. Finally, the absorbance at 450 nm of the solution in each well was determined using a BioTek ELx808™ Incubating Absorbance Microplate Reader.

#### 2.10. Statistical analysis

All data were analyzed using GraphPad Prism software 8.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA). The data are presented as the mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). For normally distributed data, multiple comparisons were made using Dunnett's test following one-way analysis of variance (ANOVA). For nonnormally distributed data, the Kruskal-Wallis test was used to make multiple comparisons between the experimental groups and the control group. The T test was used to compare the number of pups delivered and weight of weanlings between the generations that mated (F0 and F1). Statistical significance was assigned at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. General parameters

No significant differences ( $p > 0.9$ ) in body weight, food, or water consumption were found in both experimental groups compared to the Control group. The number of pups born and their weight after weaning did not differ significantly among the groups ( $p > 0.9$ ) (Tables 1 and 2 in the [supplementary material](#)).

### 3.2. Body weight/ovary weight ratio

The ratio of ovary weight to body weight did not differ significantly among the F0 groups ( $p > 0.05$ ), but, in comparison to Group C, it increased significantly in F1 and F2 of E2, and in F2 of E1 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

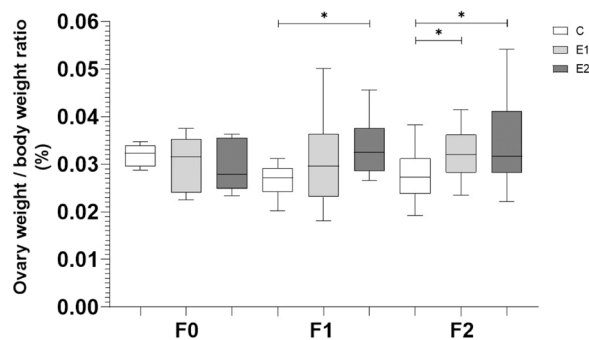
### 3.3. Follicle count and histology

The animals in Group C had significantly higher numbers of primordial follicles than groups E1 and E2 in all three generations. Also, group C had significantly higher number of developing follicles than group E2 in F0, and significantly higher in comparison with both E1 and E2 in F1 and F2 ( $p < 0.005$ ). Furthermore, Group C had significantly more ovarian antral follicles in F0 and F2 compared to E1 and E2 groups, and only differed significantly with E1 in F1 ( $p < 0.005$ ). Termination of the treatment in F0 did not result in recovery of the number of developing, antral follicles, or corpus luteum and albicans in later generations of group E1. The counts of corpus luteum and albicans in Group C were significantly higher than those in groups E1 and E2 in F0, and significantly higher than group E1 in F2 (Fig. 2).

According to Fig. 3, histological examination of the ovaries of the animals in Group C showed no apparent pathological modification in any of the three generations; in contrast, the ovaries of the animals in experimental groups displayed histological alterations. The F0 experimental groups showed thickening of the germinal epithelium, detachment of granulosa cells within the follicles, and slight vacuolation of the surrounding cortical cells. In the mice belonging to E1 and E2 groups of the F1 generation, massive damage to the ovaries was apparent; all cellular compartments presented large white spaces, there was vacuolation of the cells surrounding the follicles, and increased vascularization, indicating possible inflammation; some precipitate was observable, mainly in the follicles (Fig. 3). In the mice of the F2 generation, more than half of the individuals in the E2 group displayed exacerbated ovarian damage similar to that seen in the F1 mice; the ovaries of the remaining individuals in the E2 group, as well as those of all the animals in the E1 group had histological characteristics similar to those of F0 animals, including thickened germinal epithelium, in some cases without a defined structure, and loss of a well-defined corpus luteum, with slightly vacuolated surrounding cells. In both the E1 and E2 groups, precipitates were present in the follicles of some individuals.

### 3.4. Redox state (RS) (GSH/GSSG ratio)

Exposure to a low concentration of Pb significantly affected the RS in the F0 animals, and this modification was still detectable in the



**Fig. 1.** Generational effect of exposure to Pb on ovary weight/body weight ratio in female (CD1) mice. The results represent the mean  $\pm$  standard error of the mean. C (control), E1 (unigenerational exposure), and E2 (multigenerational exposure). The numbers of mice per group were F0 (C:4, E1:4, E2:4), F1 (C:4, E1:6, E2:4), and F2 (C:5, E1:5, E2:6). \* Statistically significant difference relative to the paired negative controls ( $p < 0.05$ ).

subsequent generations (F1 and F2), even after termination of the treatment (E1). The results show that the amount of GSH present is significantly lower than the amount of GSSG, indicating severe OS (Fig. 4).

### 3.5. Protein carbonylation (PC)

The E2 groups of F1 and F2 contained significantly higher amounts of carbonylated proteins compared to Group C ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the PC levels of the animals in Group E1 were significantly higher than those of Group C in the F2 generation (Fig. 5).

### 3.6. Lipid peroxidation (LP)

The MDA analysis did not show a significant difference in the F0 and F2 groups. Nevertheless, in the F1 animals, LP levels were significantly higher in Groups E1 and E2 than in Group C (Fig. 6).

### 3.7. FSH and LH analysis

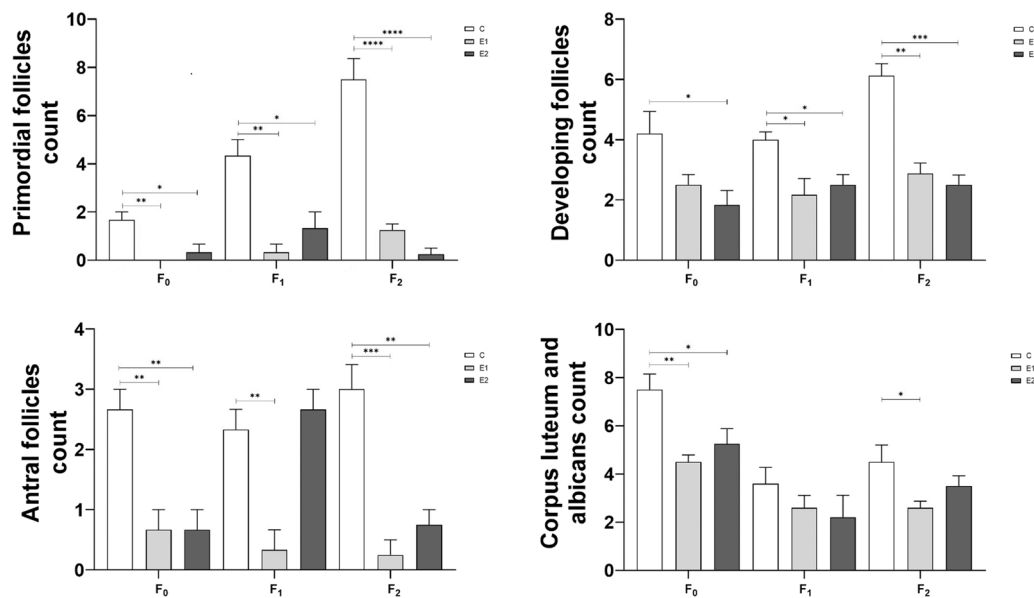
All females were sacrificed when in diestrus, a stage in which FSH and LH levels are lower than in other phases of the estrus cycle. Group E2 of F0 showed a significant decrease in LH hormone concentration compared to Group C ( $p < 0.05$ ) at this phase of the estrus cycle, while FSH levels showed no significant alterations. Generations F1 and F2 showed no significant difference in the serum concentration of either hormone (Fig. 7).

## 4. Discussion

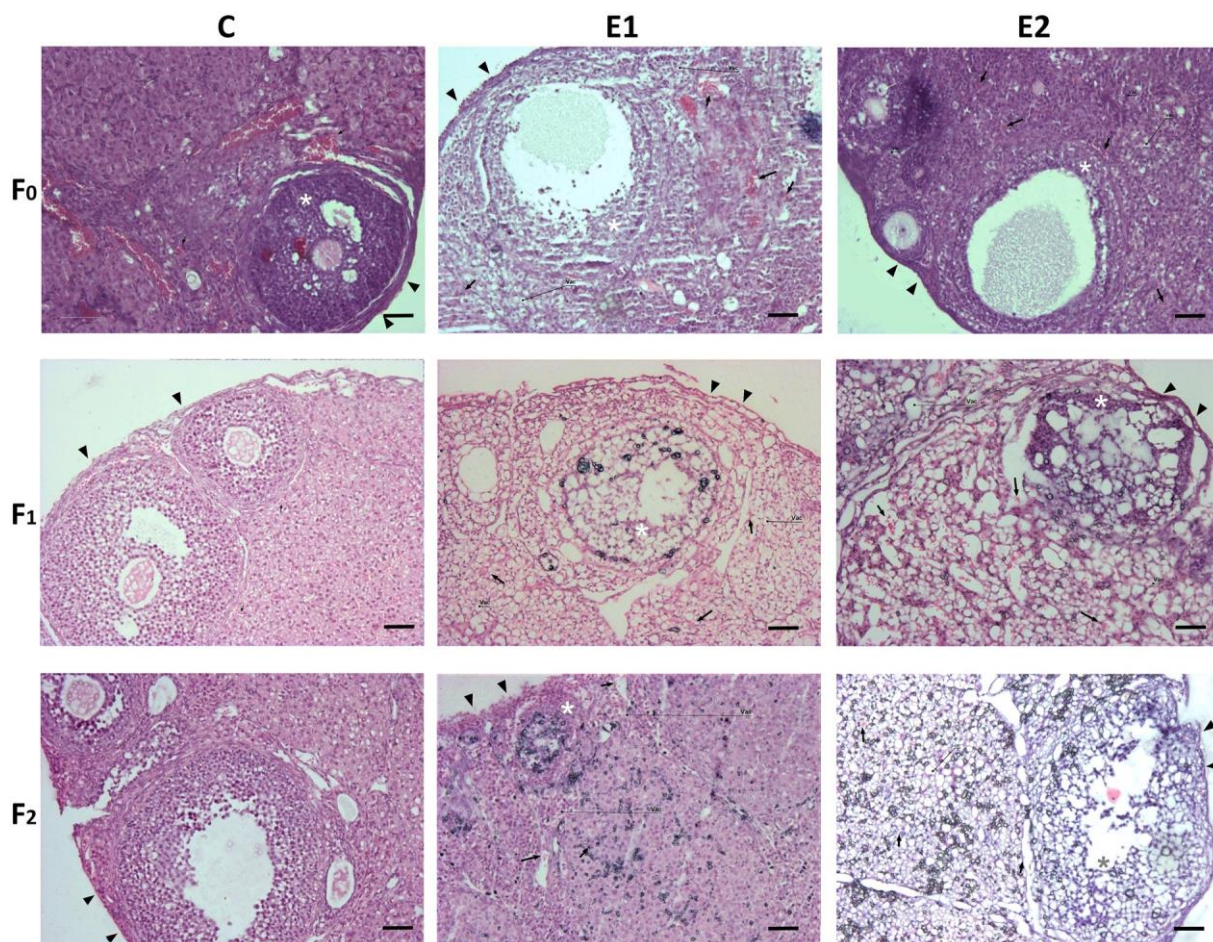
This is the first study in which the multigenerational effects of a low concentration Pb exposure on ovarian histology and OS have been reported, although effects of exposure to high Pb concentrations on reproductive health have previously been reported [21]. The only known research with a similar focus known to the authors of this study addresses rats that received uninterrupted exposure to high PbA concentrations (20 ppm) through their drinking water and its effects on general parameters such as body weight, food and water intake, number of litters, number of newborns, and number of weanlings focusing primarily on the second and third generations [29]. In comparison, this work evaluated, in addition, histological alterations and changes in the levels of hormones and OS biomarkers in animals exposed at a considerably lower concentration (0.2 ppm PbA), focusing on F0 and subsequent generations that received continuous or discontinuous treatments.

Various ovarian pathologies are intimately linked to the capacity of Pb to augment ROS production without undergoing redox modifications [16,18,20]. These changes lead to oocyte death, infertility, premature ovarian failure (POF), and estrous cycle irregularities [14]; thus, the ability of organisms that experience Pb exposure to become pregnant, as well as the number of offspring born, could be seriously affected. Interestingly, in this study, the number of pregnant females and the number and weight of the offspring did not differ significantly among the groups, despite the changes in the duration of the phases of the estrous cycle in both the E1 and E2 groups over three successive generations (data not shown). On the other hand, although the ovary weight/body weight ratio did not differ significantly among the F0 groups, it was significantly higher in Group E2 in F1, and both Group E1 and Group E2 had significantly higher ovary weight/body weight proportions than did Group C in F2. This is important, as ovarian weight gain and enlargement in humans are associated with ovarian edema and polycystic ovarian syndrome [37,38]. Interestingly, these alterations are observable after exposure to Pb at a low concentration (0.2 ppm) for a relatively short period (approximately 20 weeks); in comparison, in Lukacinova's research animals were exposed to Pb at ten times that concentration (20 ppm) for a prolonged period (78 weeks) [29]. Therefore, the lack of large changes in the general parameters measured

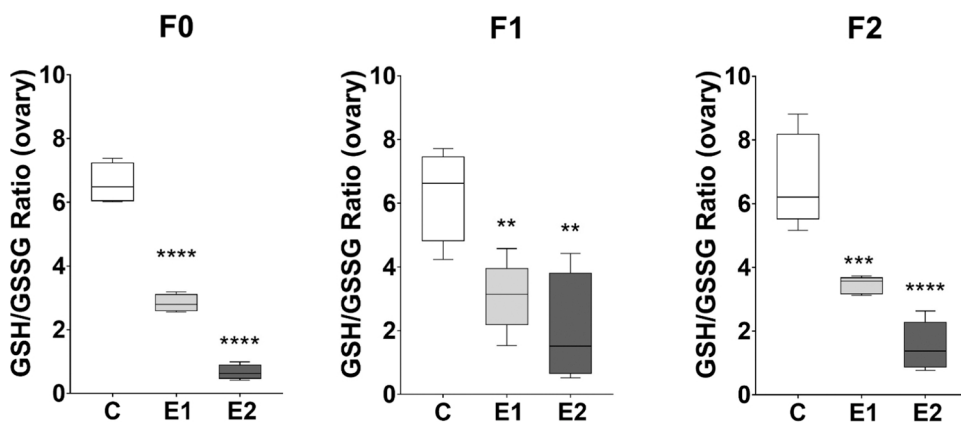




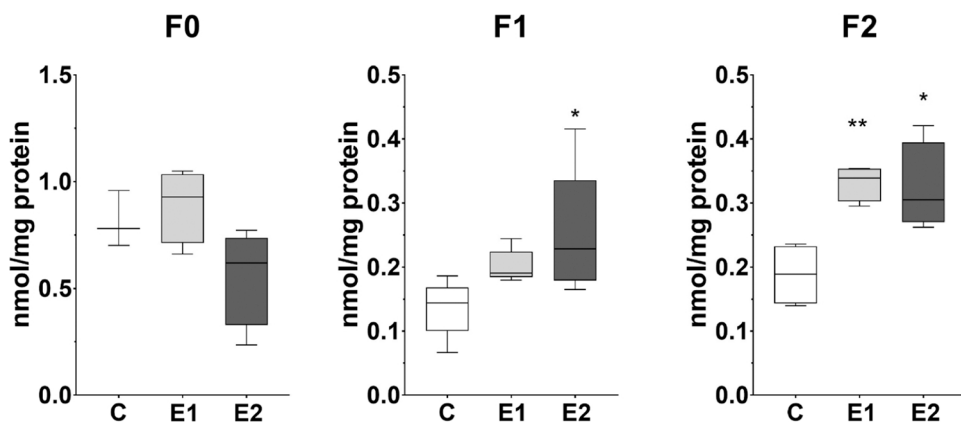
**Fig. 2.** Follicular structure count. The structures were observed after H&E staining of the ovaries of CD1 mice in Groups C (control), E1 (unigenerational), and E2 (multigenerational) when the animals were 140 days of age (4 ½ months). The numbers of mice per group were F0 (C:4, E1:4, E2:4), F1(C:4, E1:6, E2:4), and F2 (C:5, E1:5, E2:6) (\* p < 0.05, \*\* p < 0.005, \*\*\* p < 0.0005, \*\*\*\* p < 0.0001).



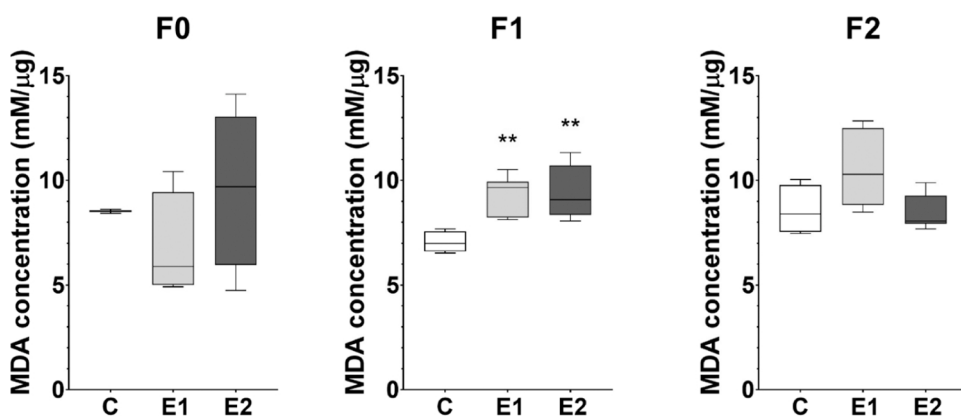
**Fig. 3.** Generational effect of Pb exposure on mouse ovarian histology over three generations, measured when the mice were 140 days of age. The alterations marked in the figure are increased vascularization (→), thickening or loss of structure in the germinal epithelium (▼), alterations in the follicles (\*), and vacuolation of the cells surrounding the follicles (Vac). H&E, 1000 X.



**Fig. 4.** Generational effect of Pb on the GSH/GSSG ratio in mice ovary. The ratio of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG) in the ovaries of CD1 mice that received the respective treatments was determined by HPLC when the animals were 140 days of age. Statistically significant differences compared with the paired control groups are marked with \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.005$ ), and \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ). The comparisons were established using ANOVA and a post hoc Dunnett test. The numbers of mice per group were F0 (C:4, E1:4, E2:4), F1 (C:4, E1:6, E2:4), and F2 (C:5, E1:5, E2:6).



**Fig. 5.** Generational effect of Pb on protein carbonylation in mice ovary. The concentration of carbonylated protein in the ovaries of CD1 mice that received the respective treatments was determined using a modification of the method described by Mesquita et al. [30] when the animals were 140 days of age. Statistically significant differences compared with the paired control groups are marked with \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ). The comparisons were established using ANOVA and a post hoc Dunnett test. The number of mice per group were F0 (C:3, E1:4, E2:4), F1 (C:5, E1:5, E2:5), and F2 (C:4, E1:4, E2:4).



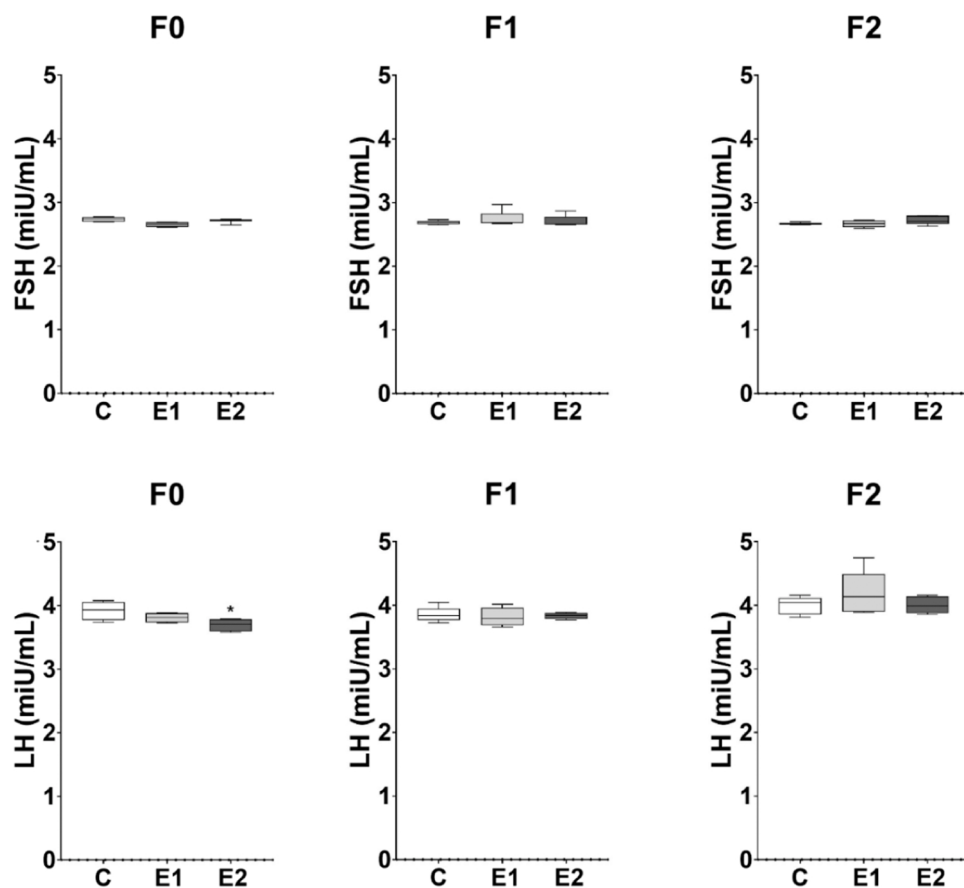
**Fig. 6.** Generational effect of Pb on lipid peroxidation in mice ovary. The levels of thiobarbituric acid reactive substances in the ovaries of CD1 mice that received the respective treatments were determined spectrophotometrically [36] when the animals were 140 days of age. Statistically significant differences compared with the paired control groups are marked with \*\* ( $p < 0.01$ ). The comparisons were established using ANOVA (Kruskal-Wallis for nonnormally distributed data) and a post hoc Dunnett test. The numbers of mice per group were F0 (C:2, E1:4, E2:4), F1 (C:4, E1:6, E2:6), and F2 (C:4, E1:6, E2:6).

in this study could be exacerbated after exposure for prolonged periods and does not indicate that the organisms do not experience deleterious effects over time [1,19].

In healthy organisms with optimal antioxidant capacity, GSH levels are higher than GSSG levels [39]. However, in this work, the GSH/GSSG ratio (RS) was found to be significantly unbalanced, as is typically seen in ovariectomized rats, in the experimental groups in all generations. This observation correlates with an accelerated aging process and severe OS [39]. This RS imbalance could be due to the ability of Pb to form covalent bonds with the sulfhydryl group (SH) of GSH, altering its availability and tridimensional conformation [9,18,25]. Another reason for this effect could be inhibition of glutathione reductase (GR) activity by Pb, slowing GSH regeneration, impairing the antioxidant function of

this molecule, and increasing the susceptibility of cells in the ovary to oxidative damage [12,17]. Due to the various roles GSH plays on ovarian health, the alterations observed regarding this biomarker hint at the possibility of affected tumor response, and development of pathologies such as polycystic ovarian syndrome if exposure is prolonged.

Remarkably, a significant alteration in RS, which is related to severe OS in rat liver [40], was observed in F1 and F2 even after cessation of the treatment (Group E1). The multigenerational effects of Pb in the ovary RS could be explained by the transfer of residual Pb of gestating females to descendants *in utero* and through lactation [21,24]. In addition, there is indirect evidence that female exposure to Pb causes genetic and epigenetic alterations that can be transmitted to their grandchildren [41, 42]. Therefore, early life exposure of female mice to Pb in F0 in this



**Fig. 7.** Generational effect of Pb on FSH and LH levels in the blood of female mice. The levels of both hormones were determined by ELISA using the ovaries of CD1 mice that were 140 days of age and had received the respective treatments. Statistically significant differences compared with the paired control groups are marked with \* ( $p < 0.05$ ). The comparisons were established using ANOVA and a post hoc Dunnett test. The number of mice per group were F0 (C:4, E1:4, E2:4), F1(C:4, E1:6, E2:4), and F2 (C:5, E1:5, E2:6).

study could reprogram gene expression through epigenetic modifications, and successful reproduction in organisms with altered gametes could contribute to enhanced OS in later generations.

In this study, the second and third generations of the multigenerational exposure group (E2) showed significantly higher levels of carbonylated proteins than did the control group. PC is correlated with OS and with pathological processes associated with multiple chronic degenerative diseases [23]. A similar increase has been observed in liver and granulosa cells of rodents and other species exposed to high concentrations of Pb [40,43]. Levels of this biomarker were lower only in the first generation of the experimental group, possibly because the animals were not exposed in the womb, allowing an effective response to the contaminant. Remarkably, these biomarker alterations were present since the second generation after the termination of the treatment (Group E1), a phenomenon that would not typically be expected to occur in unexposed generations, especially at the Pb concentration employed [19,27]. Thus, the PC observed in this study can cause loss of protein function, inducing subsequent cellular dysfunction and tissue damage.

OS due to Pb exposure can affect cellular lipids, altering membrane structure and function and increasing LP in ovaries [40]. Interestingly, in this study, LP levels increased significantly only in the experimental groups in the F1 generations, in animals in which histological alterations were also exacerbated. The observed results could be partially due to the fact that estradiol and estrogen exert a protective role against LP, meaning that the hypothalamic-pituitary axis is not yet compromised [24,39,44,45], or to the low concentration of Pb employed, in contrast with previous reports. The reason this biomarker increased significantly only in the second generation of this study is unknown. Although hormones are known to exert a protective effect against LP in females [39, 45], we are hesitant to conclude that this explains what we observed since the animal's RS and PC levels were significantly affected; thus, these results could be due to other factors and do not exempt organisms

from undergoing OS, inducing ovarian dysfunction due to affected protein synthesis, reduced protein content, diminished ROS scavengers' availability, inhibited antioxidant enzyme activity, altered follicular maturation, and cellular death in the ovary [14].

The activity of cellular lipids is closely linked to hormone production, a process that is known to be greatly altered by the increase in ROS caused by high Pb exposure and Pb accumulation [46]. It has been reported that exposure to Pb at concentrations as low as 0.15 ppm decreases serum levels of FSH, estradiol, and progesterone and increases LH and testosterone levels [46]. However, chronic exposure to 0.20 ppm Pb in this study caused a decrease in LH concentration only in the first experimental generation (E2); FSH levels did not change in either generation. This is relevant, as decreased LH levels have been associated with POF and hypothalamic disorders [47], both have serious health consequences including psychological distress, infertility, osteoporosis, autoimmune disorders, ischemic heart disease, and increased risk of mortality. The differential secretion patterns of FSH and LH could explain why the two hormones were not affected in the same way [45]. Moreover, the recovery of LH levels in subsequent generations and the maintenance of FSH levels in all three generations could be due to the length of the treatment, reflecting an adaptive response, or because the hypothalamic-pituitary axis still responded effectively despite the evident OS in the ovaries. Although most of the concentrations of Pb that have been reported to significantly affect hormone concentrations are higher than those used in our study [24,44], we cannot assume that other hormones were not affected, that there were no alterations in hormone peaks at stages of the estrous cycle that were not analyzed, or that the observed alterations might not be exacerbated over time [46].

The OS factors previously mentioned are closely related to the cyclic structural and functional changes in the ovaries that occur during the stages of reproduction [15]. In the present study, histological alterations in the right ovaries of both experimental groups were observed in three



successive generations, even after the cessation of the treatment (Group E1). Among the many effects that Pb exerts on the ovaries, loss of the normal organization of ovarian structures, increased follicular atresia, and a decrease in the number of available follicles appear to be the most common [19,23–26]. The main alterations observed in the present study were related to diminished number of primordial and developing follicles, changes in the integrity of the germinal epithelium, and vacuolization of cellular components. These changes were exacerbated in the second generation and partially recovered in some individuals in the third generation. The observable effects that occurred between F0 and F2 despite termination of treatment, are astounding and represent a previously unreported phenomenon. Likewise, it is worth noting that, because in mammals the right ovary is the most active and the most sensitive [25,48], the reported alterations indicate the possibility of smaller litters or overall difficulty in becoming pregnant in the future. Additionally, since females were still at an optimal age for reproduction at the end of the experiment, the question arises of whether exacerbated damage may occur at later stages of life [34,45]. It has been reported that calcium plays a vital role in stimulating endogenous sources of ROS that are important for follicular maturation, ovulation, and other processes that are intimately linked to ovarian histoarchitecture. However, an abnormal increase in calcium levels triggers OS, promoting apoptosis and other pathologies in cellular components of the ovary [11,13]. Taking this into consideration, the alterations in ovarian histology, the increase in follicular atresia, and the decrease in the number of available follicles observed in this study could also be caused by the ability of Pb to compete with this essential metal at calcium-binding sites, causing an increase in cellular free calcium and altering the Ca-ROS-dependent redox balance [49].

The reported multigenerational effects of Pb in this study are relevant to public health issues due to the environmental prevalence of Pb and its industrial use, especially in developing countries [4,6–8,37,50]. As seen in our results, the lack of alterations in general parameters does not indicate that organisms are not suffering deleterious effects on the ovaries [29–31]. In addition, it has been reported that increased serum Pb levels are highly correlated with the development of malignant ovarian tumors, polycystic ovary syndrome, and infertility in women, hinting at its potential to affect long-term reproductive capacity [1,8,37,38,50,51]. The importance of this study lies in the fact that it shows that exposure to Pb at a low concentration causes alterations in the levels of biomarkers associated with OS and changes in ovarian histology in three subsequent generations, despite cessation of the treatment. Since many countries have reported higher concentrations of Pb than the one used in this research in different environmental compartments [1,2,4,6,7], it is possible that this metal may cause undetectable damage to various organisms before pathological signs are evident.

Currently, the development of radioprotectors that exhibit high and significant antioxidant activities [52,53] promises new tools for the design and synthesis of agents that can help protect organisms from OS caused by exposure of the gonads to heavy metals. However, such valuable tools should not only be used in follow-up cases; advantage should also be taken of their potential as a prophylactic treatment for descendants of previously exposed females, taking into consideration the biochemistry of Pb, its ubiquitous presence in the environment, and the many ways it affects organisms [1,5–7,9].

The results of this study demonstrate that a lack of significant differences in general parameters such as body weight, number of pups delivered, and weaning weight does not indicate that an organism has not suffered alterations in ovarian structures or in the oxidative balance within its ovaries that allow the silent development of pathologies that might severely compromise reproductive health and even affect unexposed generations. Ovarian integrity and function are pivotal to the reproductive capacity of a species and to the individual's health and quality of life. Therefore, it is crucial to consider this and future research using instruments that allow us to understand the problem more deeply, comprehensively evaluating the potential effects that exposure to low

concentrations of Pb could exert in multiple generations. Moreover, the findings in this and other reports should be used as valuable parameters that aid in designing new treatments that protect the populations and organisms, and support enforcement of existing regulations that benefit human and environmental health.

## 5. Conclusions

Exposure to a low concentration of Pb causes alterations in the levels of OS-related biomarkers, such as RS and PC, in mouse ovaries. These biomarkers show significant modifications even after the termination of the treatment, and the alterations persist in later generations. The observation of alterations in OS biomarkers in later generations even after termination of the treatment, can be explained by previous studies in which it was reported that Pb stored in mother's bones can be liberated and transmitted to the offspring during gestation and lactation as well as by the presence of inherited epigenetic alterations. Exposure to Pb at a low concentration affects the number of follicles in the ovaries of female mice in three successive generations, even after termination of the treatment. In addition, all generations show compromised ovarian histoarchitecture. These results demonstrate that exposure to Pb at a low concentration causes damage that can go unnoticed and that affects the ovarian health of later generations. To protect human and animal reproductive health from this metal, these data must be considered in the follow-up of females who have at one time been exposed to Pb.

## Funding

This research received funding from the Metropolitan Autonomous University.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgment

The authors would like to thank Dr. Ángeles Guerrero, head of the vivarium at UAM-I, for the animal supply and orientation. We would also like to thank Dra. Mina Koninsberg, Dra. Margarita Díaz-Flores, Dr. Juan Ocampo-Lo'pez, Dr. Mario Lorenzana, and M.C. Rosa Dura'n-Lo'pez for allowing us to work in their laboratories and assessing this research from the viewpoints of their respective fields, as well as their students for aiding us with sample preparation in some of the analyses. Selene Karinna Trujillo-Vázquez is a CONACYT scholarship holder (No. CVU 637165).

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.reprotox.2022.12.001.

## References

- [1] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2017, June 12). Safety Standards for Lead Levels. [https://www.atsdr.cdc.gov/csem/leadtoxicity/safety\\_standards.html](https://www.atsdr.cdc.gov/csem/leadtoxicity/safety_standards.html).
- [2] CDC (Center for Disease Control and Prevention). (2010). Guidelines for the identification and management of lead exposure in pregnant and lactating women. US Department of Health and Human Services.
- [3] M. Markowitz, Lead poisoning, *Pediatr. Rev.* 21 (10) (2000) 327–335, <https://doi.org/10.1542/pir.21.10.327>.
- [4] B. Maloney, B.L. Bayon, N.H. Zawia, D.K. Lahiri, Latent consequences of early-life lead (Pb) exposure and the future: addressing the Pb crisis, *Neurotoxicology* 68 (2018) 126–132, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.06.016>.
- [5] S. Triantafyllidou, J. Burkhardt, J. Tully, K. Cahalan, M. DeSantis, D. Lytle, M. Schock, Variability and sampling of lead (Pb) in drinking water: assessing



- potential human exposure depends on the sampling protocol, *Environ. Int.* 146 (2021), 106259, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106259>.
- [6] E. Resongles, V. Dietze, D.C. Green, D.J. Weiss, Strong evidence for the continued contribution of lead deposited during the 20th century to the atmospheric environment in London of today, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 18 (26) (2021), e2102791118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2102791118>.
- [7] J. Caravanos, J. Carrelli, R. Dowling, B. Pavilonis, B. Ericson, R. Fuller, Burden of disease resulting from lead exposure at toxic waste sites in Argentina, Mexico and Uruguay, *Environ. Health* 15 (2016) 72, <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0151-y>.
- [8] S. Kumar, Occupational and environmental exposure to lead and reproductive health impairment: an overview, *Indian J. Occup. Environ. Med.* 22 (3) (2018) 128–137, [https://dx.doi.org/10.4103%2Fijoem.IJOEM\\_126\\_18](https://dx.doi.org/10.4103%2Fijoem.IJOEM_126_18).
- [9] J. Patocka, K. Cerny, Inorganic lead toxicology, *Acta Med.* 46 (2) (2003) 65–72, <https://doi.org/10.14712/18059694.2019.8>.
- [10] C.R. Bruno-Nascimento, W. Ezequiel-Risso, C.B. Reis-Martinez, Lead accumulation and metallothionein content in female rats of different ages and generations after daily intake of Pb-contaminated food, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48 (2016) 272–277, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.001>.
- [11] A. Gořlřach, K. Bertram, S. Hudcová, O. Krizanová, Calcium and ROS: a mutual interplay. Redox, *Biology* 6 (2015) 260–271, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>.
- [12] V. Mah, F. Jalilvand, Lead (II) complex formation with glutathione, *Inorg. Chem.* 51 (11) (2013) 6285–6298, <https://doi.org/10.1021/ic300496t>.
- [13] M. Tiwari, S. Prasad, T.G. Shrivastava, S.K. Chaube, Calcium signaling during meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes, *J. Cell. Physiol.* 232 (5) (2016) 976–981, <https://doi.org/10.1002/jcp.25670>.
- [14] P.B. Hoyer, *Ovarian toxicology*. 2nd ed; CRC Press. New York, United States of America, 2014, p. 371.
- [15] N. Sugino, Reactive oxygen species in ovarian physiology, *Reprod. Med. Biol.* 4 (2005) 31–44, <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2005.00086.x>.
- [16] K. Jomova, M. Valko, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology* 283 (2–3) (2011) 65–87, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>.
- [17] M. Ahamed, M.K. Siddiqui, Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions, *Clin. Chim. Acta* 383 (1–2) (2007) 57–64, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.024>.
- [18] N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. Burns-Aykin, Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage, *Curr. Top. Med. Chem.*, 1(6), 529–539 (2001), <https://doi.org/10.2174/1568026013394831>.
- [19] M. Junaid, D.K. Chowdhury, R. Narayan, R. Shanke, D.K. Saxena, Lead induced changes in ovarian follicular development and maturation in mice, *J. Toxicol. Environ. Health* 50 (2010) 31–40, <https://doi.org/10.1080/009841097160582>.
- [20] G. Flora, D. Gupta, A. Tiwari, Toxicity of lead: a review with recent updates, *Interdiscip. Toxicol.* 5 (2) (2012) 47–58, <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2>.
- [21] D.N. Sharma, L. Bhattacharya, Effects of maternal lead acetate exposure during lactation on postnatal development of ovaries in offspring of Swiss albino mice, *International Journal of Plant, Anim. Environ. Sci.* 4 (2) (2014) 419–424.
- [22] B.L. Gulson, K.J. Mizon, M.J. Korsch, J.M. Palmer, J.B. Donnelly, Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation: summary of long-term research, *Sci. Total Environ.* 303 (2003) 79–104, [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00355-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00355-8).
- [23] C. Taupeau, J. Poupon, F. Nome, B. Lefevre, Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia, *Reprod. Toxicol.* 15 (2001) 385–391, [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(01\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00139-3).
- [24] K. Panwar, R. Sharma, S. Mogra, N. Qureshi, I. Barber, Effect of lead exposure during gestation and lactation on developing ovary in Swiss mice, *Reprod. Toxicol.* 6 (1) (2011) 14–20, [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00037-0).
- [25] R. Sharma, U. Garu, K. Panwar, Developing gonads and lead exposure, *World J. Environ. Biosci.* 1 (2012) 30–37.
- [26] B. Lefevre, Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia, *Reprod. Toxicol.* 15 (2001) 385–439, [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(01\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00139-3).
- [27] E. Dumitrescu, A. Trif, D. Brezovan, R.T. Cristina, S. Petrovici, The consequences of lead acetate intake on exposure and integrity biomarkers of reproductive system in female rats at sexual maturity (two generation study), *Hum. Vet. Med.: Int. J. Bioflux Soc.* 2 (1) (2010) 19–24.
- [28] C.R. Bruno-Nascimento, W. Ezequiel-Rizo, C.B. dos Reis-Martinez, Lead accumulation and metallothionein content in female rats of different ages and generations after daily intake of Pb-contaminated food, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48 (2016) 272–277, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.001>.
- [29] A. Lukacinova, R. Benacka, E. Sedlakova, E. Lovasova, F. Nistiar, Multigenerational lifetime low-dose exposure to heavy metals on selected reproductive parameters in rats, *J. Environ. Sci. Health, Part A* 47 (9) (2012) 1280–1287, <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.672132>.
- [30] K. Li, M. Liszka, C. Zhou, E. Brehm, J.A. Flaw, R.A. Nowak, Prenatal exposure to a phthalate mixture leads to multigenerational and transgenerational effects on uterine morphology and function in mice, *Reprod. Toxicol.* 93 (2020) 178–190, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.02.012>.
- [31] M.S. Rahman, W.K. Pang, D.Y. Ryu, Y.J. Park, B.Y. Ryu, M.G. Pang, Multigenerational impacts of gestational bisphenol A exposure on the sperm function and fertility of male mice, *J. Hazard. Mater.* 416 (15) (2021), 125791, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125791>.
- [32] A.F. Ajayi, R.E. Akhibe, Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update, *Fertil. Res. Pract.* 6 (5) (2020) 15, <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>.
- [33] E.B. Prophet, Armed Forces Institute of Pathology (Estats Units d'America) & American Registry of Pathology.. Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology., 1995.
- [34] D. Hernández-Alvarez, B. Mena-Montes, R. Toledo-Pérez, G. Pedraza-Vázquez, S. P. López-Cervantes, A. Morales-Salazar, E. Hernández-Cruz, R. Lazzarini-Lechuga, R.R. Vázquez-Cárdenas, S. Vilchis-DeLaRosa, P. Posadas-Rodríguez, R. Santín-Márquez, O. Rosas-Carrasco, A. Ibañez-Contreras, A. Alarcón-Aguilar, N.E. López-Díazguerrero, A. Luna-López, M. Kohnsberg, Long-term moderate exercise combined with metformin treatment induces an anabolic response that prevents strength and muscle mass loss in old female wistar rats, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2019) 3428543, <https://doi.org/10.1155/2019/3428543>.
- [35] C.S. Mesquita, R. Oliveira, F. Bento, D. Geraldo, J. Rodrigues, J.C. Marcos, Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins, *Anal. Biochem.* 1 (458) (2014) 69–71, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>.
- [36] A.M. Jentsch, H. Bachman, P. Fürst, H.K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (2) (1996) 251–256, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).
- [37] G. Zheng, L. Wang, Z. Guo, L. Sun, L. Wang, C. Wang, Z. Zuo, H. Qiu, Association of serum heavy metals and trace element concentrations with reproductive hormone levels and polycystic ovary syndrome in a Chinese population, *Biol. Trace Elem. Res.* 167 (2015) 1–10, <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0294-7>.
- [38] E. Canaz, M. Kilinc, H. Sayar, G. Kiran, E. Ozyurek, Lead, selenium and nickel concentrations in epithelial ovarian cancer, borderline ovarian tumor and healthy ovarian tissues, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 43 (2017) 217–223, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.05.003>.
- [39] I. Baeza, J. Fdez-Tresguerres, C. Ariznavarreta, M. De la Fuente, Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats, *Biogerontology* 11 (2010) 687–701, <https://doi.org/10.1007/s10522-010-9282-7>.
- [40] P. Hasanain, G.V. Masumeh, I. Khodadadi, Effects of isoquinoline alkaloid berberine on lipid peroxidation, antioxidant defense system, and liver damage induced by lead acetate in rats, *Redox Rep.* 1 (2016) 42–50, <https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1140406>.
- [41] A. Sen, N. Heredia, M.C. Senut, S. Land, K. Hollocher, X. Lu, M.O. Dereski, D. M. Ruden, Multigenerational epigenetic inheritance in humans: DNA methylation changes associated with maternal exposure to lead can be transmitted to the grandchildren, *Nat. Sci. Rep.* 5 (2015) 14466, <https://doi.org/10.1038/srep14466>.
- [42] M. Sobolewski, K. Abston, Conrad, E. Marvin, K. Harvey, M. Susiarjo, D.A. Cory-Slechta, Lineage- and Sex-dependent behavioral and biochemical transgenerational consequences of developmental exposure to lead, prenatal stress and combined lead and prenatal stress in mice, *Environ. Health Perspect.* 128 (2) (2020), 027001, <https://doi.org/10.1289/EHP4977>.
- [43] H.S. Aglan, S. Gebremedhn, D. Salilew-Wondim, C. Neuhof, E. Tholen, M. Holker, K. Schellander, D. Tesfayem, Regulation of Nrf2 and NF-κB during lead toxicity in bovine granulosa cells, *Cell Tissue Res.* 380 (2020) 643–655, <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03177-x>.
- [44] V. Dhir, P. Dhand, Toxicological approach in chronic exposure to lead on reproductive functions in female rats, *Toxicol. Int.* 17 (2010) 1–7, <https://doi.org/10.4103/0971-6580.68340>.
- [45] R.A. Kireev, A.C.F. Tresguerres, C. Garcia, C. Ariznavarreta, E. Vara, J. Vina, J.A. F. Tresguerres, Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats, *Biogerontology* 11 (2009) 229–243, <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9242-2>.
- [46] E. Dumitrescu, R.T. Cristina, F. Muselin, Reproductive biology study of dynamics of female sexual hormones: a 12-month exposure to lead acetate rat model, *Turk. J. Biol.* 38 (2014) 581–585, <https://doi.org/10.3906/biy-1402-50>.
- [47] Razi, S., Kazmi, H. Can, A.S. (2021). Luteinizing Hormone Deficiency. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562219/>.
- [48] J.L. Wiebold, W.C. Becker, Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the mouse, *J. Reprod. Fertil.* 79 (1987) 125–134, <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0790125>.
- [49] M.A. Quintanar-Escorza, M.T. González-Martínez, M.P. Intrigao-Ortega, J. V. Calderón Salinas, Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca<sup>2+</sup>] concentration in human erythrocytes incubated with lead, *Toxicol. Vitro* 24 (5) (2010) 1338–1346, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.002>.
- [50] Y. Liu, M.M. Téllez-Rojo, B.N. Sánchez, Z. Zhang, M. Afeiche, A. Mercado-García, H. Hu, J.D. Meeker, K.E. Peterson, Early lead exposure and pubertal development in a Mexico City population, *Environ. Int.* 125 (2019) 445–451, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.021>.
- [51] L. Hsiao-Ling, W. Hsiao-Jui, H. Hsin-Yi, L. Kai-Wei, C. Ling-Chu, Relationship between risk factors for infertility in women and lead, cadmium, and arsenic blood levels: a cross-sectional study from Taiwan, *BMC Public Health* 15 (2015) 1220, <https://doi.org/10.1186/s12889-015-2564-x>.
- [52] A.M. Rabie, A.S. Tantawy, S.M.I. Badr, Design, synthesis, and biological evaluation of novel 5-substituted-1,3,4-thiadiazole-2-thiols as potent antioxidants, *Researcher* 10 (7) (2018) 21–43.
- [53] A.M. Rabie, A.S. Tantawy, S.M.I. Badr, Design, synthesis, and biological evaluation of novel 5-substituted-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-1,3,4-oxadiazoles as potent antioxidants, *Am. J. Org. Chem.* 6 (2) (2016) 54–80.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00140

Matrícula: 2183801981

La exposición crónica a baja concentración de plomo por tres generaciones: efectos morfológicos y fisiológicos en gónadas de hembras de ratones CD1.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 7 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ  
DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ  
DR. JOSEFINA CORTES ESLAVA  
DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTAN

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

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: SELENE KARINNA TRUJILLO VAZQUEZ

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

Aprobar

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



SELENE KARINNA TRUJILLO VAZQUEZ

ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

VOCAL

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

VOCAL

DR. JOSEFINA CORTES ESLAVA

SECRETARIO

DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTAN