



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

“Efecto del sultonato de perfluorohexano en la viabilidad, la comunicación intercelular ovocito – células del *cumulus*, la función mitocondrial y el daño al DNA en células del *cumulus* durante la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos”

T E S I S
Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biológicas y de la Salud
P R E S E N T A
M. en Biol. Exp. Rebeca Martínez Quezada

Comité Tutorial:
Director: Dr. Edmundo Bonilla González
Asesor externo: Dr. Pablo Enrique Domínguez López
Asesor interno: Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Ciudad de México, Mayo, 2021

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de “Expresión Génica” del Departamento de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Edmundo Bonilla González. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Pablo Enrique Domínguez López de la UMAE, Hospital de Gineco-obstetricia N° 4 “Luis Castelazo Ayala”, del Instituto Mexicano del Seguro Social y del Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo, de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 421914, que comprendió del periodo del 01 de enero de 2016 al 31 de diciembre de 2019. El doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y, además, cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PEP-20-93.

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:

Rebeca Martínez Quezada

El 27 de mayo de 2021

JURADO:

PRESIDENTE

Dr. Edmundo Bonilla González
Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-I

SECRETARIO

Iván Uriel Bahena Ocampo
Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-I

VOCAL

Pablo Enrique Domínguez López
Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva. UMAE, Hospital de Gineco-
obstetricia N° 4 "Luis Castelazo Ayala". IMSS.

VOCAL

Dra. Ana María Rosales Torres
Departamento de Producción Agrícola y Animal. DCBS. UAM-X

VOCAL

Juan José Rodríguez Mercado
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. FES-Z. UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi Comité Tutorial, por el apoyo incondicional que me brindaron. Dr. Edmundo, gracias por aceptarme en su laboratorio, ofrecerme un nuevo proyecto y permitirme trabajar en libertad, pero sabiendo que, ante cualquier eventualidad, estaría ahí. Dr. Iván, gracias por, aún sin conocerme, aceptar formar parte de esto sin dudar, por apoyarme en cada cosa que necesité, por aportar nuevas ideas y por fomentar el compañerismo en el trabajo. Dr. Pablo, gracias por la gran confianza depositada en mí, por seguirme, acompañarme y guiarme en un nuevo reto.

Al Dr. Mario Altamirano[†], de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, FES-Z, UNAM, quien, en un increíble gesto de solidaridad, luego de que aquel terrible sismo nos arrebatara nuestro laboratorio, me brindó un espacio de la Unidad a su cargo, para poder desarrollar parte del presente trabajo. A los doctores Juan José Rodríguez, Lucila Álvarez y Aníbal Mateos, quienes, además de permitirme compartir su espacio y sus equipos, me compartieron sus conocimientos y me brindaron un trato siempre cálido y cordial que me hizo sentir “en casa”. Gracias a todos ustedes, por su imprescindible e invaluable apoyo.

A los miembros del jurado, por su labor en la revisión del presente manuscrito, por el tiempo invertido y por sus amables aportaciones, que contribuyeron a enriquecer el mismo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio; a esos que reencontré en mi camino y a los que tuve el placer de conocer durante el doctorado. Alejandro y Mario, gracias por enseñarme el arduo trabajo de colectar ovocitos, por su apoyo técnico y metodológico, por sus consejos, por el café en las tardes duras y por tantas cosas más. Jessica, Luisa y Carlos, gracias porque, aunque no era “ni de aquí, ni de allá”, siempre me hicieron saber que tenía un lugar entre ustedes; gracias por integrarme y por compartirme su entusiasmo y alegría. Gerardo, gracias por ser un excelente alumno, por tu disposición para aprender y para ayudar, por todo tu esfuerzo y por el resultado de un gran trabajo, que podrás disfrutar plasmado en esta tesis y en nuestro artículo; gracias también por escucharme y por ser el apoyo emocional que algún día necesité.

A mis extraordinarios amigos, por estar en las buenas, en las malas y en las peores, en las tristezas, en las alegrías, en los logros... Deisy, Ivis, Mariel, Memo, Selene, no tengo palabras para agradecerles todo lo que hacen por mí.

A mi gran maestro de vida, por todo lo que he aprendido a su lado. Gracias, Alexis, por ser parte de mi historia, por el amor, por los consejos, por los regaños, por ser mi refugio cuando no sabía a donde ir, porque en tus brazos siempre encontré la paz.

A mi hermosa familia. Gracias, hermanos, sobrinos, cuñados, porque siempre puedo contar con ustedes. Mamá y papá, gracias por todo lo que me han dado, gracias por todo lo que me han enseñado, gracias por ser mis grandes ejemplos de fuerza, trabajo, dedicación, respeto y amor.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Los compuestos perfluorados	1
1. 2. El sulfonato de perfluorohexano	2
1. 2. 1. Características	2
1. 2. 2. Toxicocinética	5
1. 2. 3. Vías de exposición	6
1. 2. 4. Efectos en la salud	6
1. 2. 5. Efectos en la salud reproductiva	8
1. 3. La maduración del ovocito	9
1. 3. 1. El cAMP en la maduración del ovocito	9
1. 3. 2. Las células del <i>cumulus</i> en la maduración del ovocito	11
1. 3. 3. Las uniones <i>gap</i> en la maduración del ovocito	12
1. 3. 4. La función mitocondrial en la maduración del ovocito	13

2. ANTECEDENTES	14
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5. 1. Objetivo general.....	18
5. 2. Objetivos particulares	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6. 1. Reactivos	19
6. 2. Obtención de complejos ovocito – células del <i>cumulus</i>	19
6. 3. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	20
6. 4. Tratamiento con PFHxS.....	20
6. 5. Evaluación de la viabilidad.....	21
6. 6. Evaluación de la maduración.....	22
6. 7. Ensayo de comunicación intercelular ovocito – células del <i>cumulus</i>	23
6. 8. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$).....	24
6. 9. Evaluación del daño al DNA en células del <i>cumulus</i>	25
6. 10. Análisis estadístico	26
7. RESULTADOS	27
7. 1. Efecto citotóxico del PFHxS.....	27
7. 2. Concentraciones subletales de PFHxS inhiben la maduración <i>in vitro</i>	28

7. 3. El PFHxS no afecta la comunicación intercelular en COCs.....	29
7. 4. El PFHxS modifica el $m\Delta\psi$ del ovocito a las 18 h de MIV	32
7. 5. El PFHxS induce daño al DNA en células del <i>cumulus</i>	34
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES.....	42
10. PERSPECTIVAS.....	43
11. REFERENCIAS.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de PFHxS en diversos fluidos corporales de humano.....	4
Tabla 2. PFHxS en muestras de suero y orina de trabajadores de una planta fluoroquímica de la provincia de Hubei, China.	5
Tabla 3. Efecto del PFHxS en la progresión meiótica en ovocitos porcinos in vitro	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del PFHxS.....	2
Figura 2. Señalización celular que conduce al arresto o a la reanudación de la meiosis..	10
Figura 3. COCs en fresco sin teñir x40	19
Figura 4. Conversión de MTT a cristales de formazano por enzimas reductasas mitocondriales.....	21
Figura 5. Microfotografías de los distintos estadios de desarrollo meiótico, evaluados por epifluorescencia con tinción con Hoechst 33342.....	22
Figura 6. Conversión de calceína-AM a calceína fluorescente.....	23
Figura 7. Ilustración esquemática que muestra la entrada de JC-1 en las mitocondrias y la generación de agregados J.....	25
Figura 8. DNA dañado en un ensayo cometa	26
Figura 9. Viabilidad de ovocitos porcinos expuestos a PFHxS durante la MIV	27
Figura 10. Efecto de la exposición a PFHxS en la maduración in vitro de ovocitos porcinos	28
Figura 11. Efecto de la exposición a PFHxS sobre la captura de calceína en el ovocito ..	30
Figura 12. Captura de calceína en COCs expuestos a PFHxS	31
Figura 13. Efecto de la exposición a PFHxS en el potencial de membrana mitocondrial después de 18 y 44 h de MIV	32
Figura 14. Potencial de membrana mitocondrial en ovocitos expuestos a PFHxS.	33
Figura 15. Daño al DNA en células del cumulus expuestas a PFHxS durante la MIV.	34
Figura 16. Cometas de CCs después de la exposición a PFHxS.....	35

ABREVIATURAS FRECUENTES

CCs:	Células del <i>cumulus</i>
CIM ₅₀ :	Concentración media de inhibición de la maduración
CL ₅₀ :	Concentración letal media
COCs:	Complejos ovocito – células del <i>cumulus</i>
GJIC:	Comunicación intercelular mediada por uniones gap, por sus siglas en inglés
GVBD:	Rompimiento de la vesícula germinal, por sus siglas en inglés
MI:	Metafase I
MII:	Metafase II
MIV:	Maduración <i>in vitro</i>
m $\Delta\Psi$:	Potencial de membrana mitocondrial
PFCs:	Compuestos perfluorados
PFDA:	Ácido perfluorodecanoico
PFHxS:	Sulfonato de perfluorohexano
PFOA:	Ácido perfluorooctanoico
PFOS:	Sulfonato de perfluorooctano

RESUMEN

El sulfonato de perfluorohexano (PFHxS) es uno de los compuestos perfluorados más abundantes en el medio ambiente y en fluidos corporales de humano. Aunque la exposición a este compuesto se ha asociado con una disminución de la fertilidad, no se han descrito los mecanismos moleculares y celulares subyacentes. Los efectos reproductivos adversos del PFHxS podrían basarse en alteraciones en la maduración de los ovocitos, un proceso mediante el cual, éstos, adquieren su competencia para la fertilización. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de PFHxS sobre la viabilidad y maduración de los ovocitos porcinos *in vitro*, así como los efectos sobre la comunicación intercelular mediada por uniones *gap* (GJIC, por sus siglas del inglés *gap-junctional intercelular communication*) en complejos ovocito-*cumulus* (COCs), el potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\Psi$) de ovocitos y el daño al DNA en las células del *cumulus*, como posibles mecanismos de acción. El PFHxS indujo citotoxicidad (concentración letal media, $CL_{50} = 329.1 \mu\text{M}$) e inhibición de la maduración de los ovocitos (concentración inhibitoria media, $CIM_{50} = 91.68 \mu\text{M}$). La GJIC no se vio afectada en los COCs expuestos. Sin embargo, el $m\Delta\Psi$ se redujo significativamente en los ovocitos expuestos a PFHxS en la etapa de rompimiento de la vesícula germinal (GVBD, por sus siglas en inglés). Además, la exposición a PFHxS indujo daño al DNA en las células del *cumulus*. Por tanto, la inhibición de la maduración de ovocitos por PFHxS podría atribuirse a una disminución del $m\Delta\Psi$ de ovocitos durante el GVBD y al daño del DNA en las células del *cumulus* que dan soporte al ovocito.

Palabras clave: Maduración del ovocito, cerdo, PFHxS, comunicación intercelular mediada por uniones *gap*, potencial de membrana mitocondrial, daño al DNA.

ABSTRACT

Perfluorohexane sulfonate (PFHxS) is one of the most abundant perfluorinated compounds in the environment as well as in human body fluids. Exposure to this compound has been correlated to a decrease in human fertility, although the molecular and cellular mechanisms underlying this correlation have not been described. The adverse reproductive effects of PFHxS could be based on alterations in oocyte maturation, the process rendering oocytes competent for fertilization. The aim of this study was to evaluate the effect of PFHxS on porcine oocyte viability and maturation in vitro, as well as on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in cumulus–oocyte complexes (COCs), oocyte mitochondrial membrane potential ($m\Delta\Psi$) and DNA damage in cumulus cells, as possible mechanisms of action. PFHxS caused cytotoxicity (medium lethal concentration, $LC_{50} = 329.1 \mu\text{M}$) and inhibition of oocyte maturation (medium inhibitory concentration, $MIC_{50} = 91.68 \mu\text{M}$). GJIC was not affected in exposed COCs. However, $m\Delta\Psi$ was significantly decreased in PFHxS-exposed oocytes at the germinal vesicle breakdown (GVBD) stage. In addition, exposure to PFHxS induced DNA damage in cumulus cells. Thus, inhibition of oocyte maturation by PFHxS could be attributed to a decreased oocyte $m\Delta\Psi$ at the GVBD and to DNA damage of the cumulus cells that support the oocyte.

Keywords: Oocyte maturation, pig, PFHxS, gap-junctional intercellular communication, mitochondrial membrane potential, DNA damage.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Los compuestos perfluorados

Los compuestos perfluorados (PFCs, por sus siglas en inglés) son compuestos derivados de un hidrocarburo, donde los átomos de hidrógeno han sido reemplazados por átomos de flúor mediante un proceso industrial de fluorinación electroquímica o telomerización. Están constituidos por un esqueleto de carbono y una molécula funcional cargada, típicamente un grupo carboxilato, sulfonato o fosfonato (Lau et al., 2007).

La fuerza del enlace carbono-flúor otorga a los PFCs una gran estabilidad química, que resulta en su resistencia a la inflamabilidad, a la degradación por ácidos o bases fuertes o agentes oxidantes y a la fotólisis, haciéndolos prácticamente invulnerables a la degradación ambiental y metabólica. Tales características favorecen su persistencia en el ambiente y su acumulación en los organismos (Lau et al., 2007).

De hecho, dada su elevada persistencia en el ambiente, su distribución global, su potencial bioacumulación y su toxicidad, los PFCs han sido considerados contaminantes orgánicos persistentes por la Convención de Estocolmo. Sin embargo, estos compuestos son ampliamente usados en la elaboración de productos industriales y de artículos de consumo humano, por ejemplo, como constituyentes de cera para pisos, adhesivos, espuma de extinción de incendios y aislantes de cables eléctricos, como emulsificantes en productos de limpieza o como componentes en pesticidas, contenedores de alimentos, shampoos, pastas dentales, utensilios antiadherentes, ropa, entre otros (Kannan et al., 2004; Olsen et al., 2007; Renner, 2001).

La exposición a estos derivados químicos ha sido asociada a una gran variedad de efectos adversos en la salud. Estudios en animales han encontrado que los PFCs son capaces de inducir hepatotoxicidad, toxicidad en el desarrollo, alteraciones en los sistemas inmune y endocrino (Lau et al., 2007), efectos neuroconductuales adversos, toxicidad y muerte neonatal y tumores en múltiples órganos, así como alteraciones en la función reproductiva (Post et al., 2012). En estas últimas se incluyen cambios en las concentraciones de hormonas sexuales (Maisonet et al., 2015; Y. Zhou et al., 2016), alteraciones en la cantidad y calidad del semen (Joensen et al., 2009; Toft et al., 2012), incremento en la incidencia de abortos espontáneos

(Jensen et al., 2015), irregularidades menstruales (W. Zhou et al., 2017), disminución de la fecundidad (Fei et al., 2009; Vélez et al., 2015) y reducción de las tasas de fertilización (Governini et al., 2011).

En el ambiente, existen alrededor de 20 PFCs, aunque los más comúnmente encontrados son el sulfonato de perfluorooctano (PFOS), el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y el sulfonato de perfluorohexano (PFHxS).

1. 2. El sulfonato de perfluorohexano

1. 2. 1. Características

El sulfonato de perfluorohexano (ácido 1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,6 - tridecafluorohexano - 1 - sulfónico, según la IUPAC) es un PFC de cadena corta (6 carbonos de longitud). Consta de una cadena alquilo perfluorada, fijada al azufre del ácido sulfónico (o sulfonato, en su forma aniónica) (Figura 1). Es una molécula relativamente neutra, de peso molecular 400.12. g/mol, de densidad igual a 1.841 g/cm³ y con baja solubilidad en agua (6.2 mg/L a 25 °C) (NCBI, 2020).

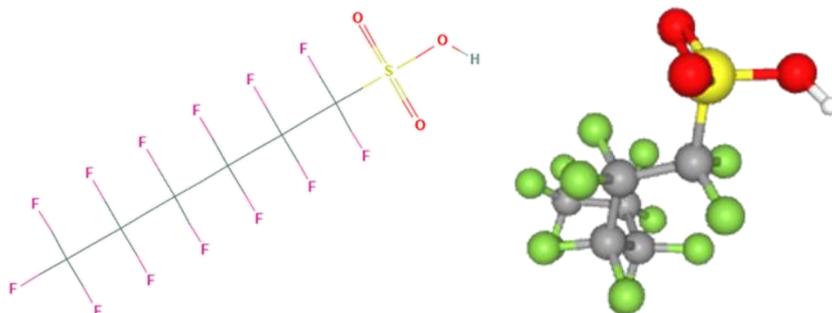


Figura 1. Estructura química del PFHxS. A la izquierda se muestra la estructura 2D, a la derecha, la conformación 3D (tomadas de NCBI, 2020).

Es usado como surfactante, en la fabricación de fluoropolímeros y como constituyente en los revestimientos protectores contra agua y manchas en alfombras, papel y textiles, así como en soluciones para tratamiento de alfombras y en espumas de extinción de incendios (I. Lee & Viberg, 2013).

Es ampliamente distribuido en el ambiente (hallándose en agua, suelo y aire), así como en muestras biológicas, en humanos y animales. La vida media de eliminación tiene una amplia variabilidad entre especies, siendo mucho más lenta en humanos, en quienes ha sido estimada en, al menos, 8.5 años, aunque algunos autores la han estimado hasta en 15.5 años, evidenciando así su potencial bioacumulación (Lau et al., 2007; Olsen et al., 2007; Sundström et al., 2011; Worley et al., 2017).

Es detectado en elevadas concentraciones en fluidos corporales de humanos, principalmente en sangre (Guruge et al., 2005), aunque su presencia también ha sido reportada en orina (Calafat et al., 2019; Worley et al., 2017), fluido seminal (Guruge et al., 2005), fluido folicular (Heffernan et al., 2018; Kang et al., 2020; McCoy et al., 2017; Petro et al., 2014), sangre de cordón umbilical (Arbuckle et al., 2013) y leche materna (Kubwabo et al., 2013; Sundström et al., 2011).

Las concentraciones de PFHxS, que han sido descritas por diversos autores, varían dependiendo del país donde se realice el análisis, de si se trata de poblaciones rurales o urbanas e incluso han presentado variaciones a través del tiempo.

La tabla 1 muestra algunas de las concentraciones encontradas en la población general, en diversos fluidos corporales. En la tabla 2 se pueden observar las altas concentraciones halladas en población expuesta laboralmente; como ejemplo se muestra el estudio llevado a cabo con trabajadores de una planta fluoroquímica en China.

Tabla 1. Concentración de PFHxS en diversos fluidos corporales de humano

Muestra	Concentración (ng/mL)	País de estudio	Referencia
Suero	<1.4–66.3	EEUU	Guruge et al., 2005
	<1.4–40.3	EEUU	Guruge et al., 2005
	<5.0–21.4	EEUU	Guruge et al., 2005
	<1.3–13.6	EEUU	Guruge et al., 2005
	<1.0–1.4	Italia	Guruge et al., 2005
	<1.0–1.8	India	Guruge et al., 2005
	0.779	Sri Lanka	Guruge et al., 2005
	0.3	Bélgica	Petro et al., 2014
1.04	UK	Heffernan et al., 2018	
Sangre completa	<1.0–3.8	Japón	Guruge et al., 2005
Orina	0.07-0.1	EEUU	Calafat et al., 2019
Fluido seminal	0.037	Sri Lanka	Guruge et al., 2005
Fluido folicular	0.515	China	Kang et al., 2020
	0.3	Bélgica	Petro et al., 2014
	0.88	UK	Heffernan et al., 2018
Sangre de cordón umbilical	0.579	Canadá	Arbuckle et al., 2013
Leche materna	0.004–0.100	China	Kubwabo et al., 2013
	0.085	Suecia	
	ND-0.025	Japón	
	0.0145	EEUU	
	<0.002-0.059	Asia	
	0.160-0.180	Alemania	
	0.040	España	
	<0.020-0.030	Alemania	
	<LOD-4.370	Alemania	
	0.015	Suecia	
	0.080	Alemania	
	<LOD-0.015	China	
0.0072	Corea del sur		
0.0059-0.114	Suecia		

LOD: Límites de detección, por sus siglas en inglés

ND: No detectable

Tabla 2. PFHxS en muestras de suero y orina de trabajadores de una planta fluoroquímica de la provincia de Hubei, China.

Grupo	Suero (ng/mL)		Orina (ng/mL)	
Todos los trabajadores				
Todos los Trabajadores	N=302	Media: 1855	N= 274	Media: 3.9
		Rango: LOD-19837		Rango: LOD-77.1
Dividido por área de trabajo				
Departamento electrolítico	N=74	Media: 1469	N= 67	Media: 2.3
		Rango: 46.6–6759		Rango: LOD-8.3
Departamento de sulfonación	N=101	Media: 3778	N=98	Media: 7.1
		Rango: 96.1–15700		Rango: LOD-77.1
Edificio de investigación	N=27	Media: 842	N= 25	Media: 1.9
		Rango: 3.0–3360		Rango: LOD-7.6
Departamento de agentes de acabado de tejidos	N=8	Media:1956	N=8	Media: 3.5
		Rango: 550–4690		Rango: 0.79–7.1
Oficina de administración	N=92	Media: 331	N=76	Media: 0.93
		Rango: LOD-3350		Rango: LOD-8.1

LOD: Límites de detección, por sus siglas en inglés. (modificado de Fu et al., 2016).

1. 2. 2. Toxicocinética

Por su naturaleza química, el PFHxS no puede ser metabolizado y entra a la circulación enterohepática (Olsen et al., 2007).

Se ha demostrado que la distribución es principalmente extracelular y se encuentra en plasma a una concentración de 1 - 500 µg/mL. Se une fuertemente a la albúmina (99.7 – 99.9 %) y muestra afinidad por β-lipoproteínas (64.1 %). También es capaz de unirse a fracciones de α- y γ-globulina y tiene interacciones menores con transferrina (Olsen et al., 2007).

Se bioacumula principalmente en hígado y riñón, aunque concentraciones bajas también han sido encontradas en tejido muscular. No se acumula en tejido graso (Kowalczyk et al., 2013).

La principal vía de excreción es la orina, sin embargo, las mujeres tienen rutas de eliminación adicionales tales como la menstruación y la lactancia (Beesoon et al., 2012; Lorber et al., 2015; Mondal et al., 2014; Olsen et al., 2007).

1. 2. 3. Vías de exposición

La población general está expuesta a este contaminante, principalmente, por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas, aunque la inhalación del aire del ambiente y, más aún, de los sistemas de aireación de algunos hogares representa una fuente de exposición importante (D'Hollander et al., 2010; Fromme et al., 2009; Shoeib et al., 2005).

La ingestión o inhalación de polvo, el consumo de leche materna y la extinción de incendios, también representan fuentes potenciales de exposición a PFHxS (Beesoon et al., 2012; Jin et al., 2011; Mondal et al., 2014).

1. 2. 4. Efectos en la salud

Se ha sugerido una asociación significativa entre la exposición a PFHxS y efectos deletéreos en la salud, entre los que se incluyen alteraciones en los sistemas endocrino, nervioso y reproductivo (Ali et al., 2019).

Estudios en animales han señalado que la exposición a PFHxS se relaciona con cambios en el metabolismo de lipoproteínas, neurotoxicidad y alteraciones en el desarrollo (Bijland et al., 2011; Cassone, Taylor, et al., 2012; Cassone, Vongphachan, et al., 2012; I. Lee & Viberg, 2013).

Un estudio demostró que, ratones E3L.CETP, expuestos vía ingesta (≈ 6 mg/kg/día, en la dieta) a este compuesto, tienen niveles plasmáticos significativamente bajos de triglicéridos, colesterol total (CT) y colesterol asociado a lipoproteínas de alta- y muy baja densidad (HDL-C y VLDL-C, respectivamente), además, la exposición a PFHxS indujo hepatomegalia acompañada de un alto contenido de triglicéridos hepáticos. Tales efectos podrían ser atribuidos a la activación de PPAR α y PXR/CAR (Bijland et al., 2011).

En un modelo de ratón, la exposición neonatal a PFHxS (6.1 y 9.2 mg/kg de peso corporal, como una sola dosis oral, a las madres gestantes), resultó neurotóxica durante el pico de desarrollo cerebral y afectó niveles de proteínas que son esenciales para un neurodesarrollo

normal, lo cual puede repercutir en el comportamiento en el adulto y afectar su función cognitiva (I. Lee & Viberg, 2013).

En pollos, la exposición *in ovo* a PFHxS (38000 ng/g de huevo) se relaciona con un incremento en la mortalidad embrionaria, alteraciones en el desarrollo del embrión, disminución en los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas y cambios en la expresión de genes involucrados en la homeostasis de estas hormonas que, a su vez, se asocian con defectos en el neurodesarrollo embrionario (Cassone, Taylor, et al., 2012; Cassone, Vongphachan, et al., 2012).

En humanos, se han reportado asociaciones similares. Por ejemplo, un estudio demostró que la probabilidad de sufrir trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), incrementa en niños cuyas concentraciones séricas de PFHxS son elevadas. El estudio reveló que un incremento de 2.9 ng/mL en la concentración sérica de este compuesto, incrementa 1.19 veces la posibilidad de sufrir TDAH en niños de entre 12 y 15 años (Hoffman et al., 2010).

En cuanto al metabolismo de lípidos, se ha descrito una asociación significativa entre los niveles de CT, HDL-C, LDL-C (colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad) y el índice TC/HDL-C, con concentraciones plasmáticas elevadas de PFHxS. La concentración media encontrada en plasma fue de 2.46 ng/mL y el análisis de cuartiles mostró una tendencia creciente para CT, LDL y no-HDL (Fisher et al., 2013).

La exposición a este compuesto, también ha sido relacionada con la alteración de la función tiroidea, encontrándose una asociación negativa con la concentración de T4 (tiroxina) en hombres; contrariamente, las concentraciones de T3 (triyodotironina) y T4, en mujeres, incrementan en tanto la concentración de PFHxS es más elevada. Un incremento de 1 unidad en el log natural de la concentración de PFHxS (cuya media en suero es igual a 2 ng/mL, según el estudio), se asoció con un aumento de T4 total en 0.26 g/mL y T3 total en 4.074 ng/dL en las mujeres y una disminución de la T4 libre en 0.016 ng/dL en hombres. Asimismo, en mujeres embarazadas, la concentración de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) se asocia positivamente con la concentración sérica de PFHxS, lo que podría repercutir en el crecimiento y desarrollo fetal (Wen et al., 2013; Yan et al., 2014).

Además, un estudio longitudinal demostró que la exposición prenatal a PFHxS está relacionada con un menor peso al nacer, en comparación con niñas que no fueron expuestas.

El PFHxS fue detectado en el 100% de las muestras (mediana, 1.6 ng / mL). En promedio, las niñas nacidas de madres con concentraciones de este compuesto ubicadas en el tercil superior pesaron 108 g menos al nacer que las niñas nacidas de madres con concentraciones en el tercil inferior (Maisonet et al., 2012).

1. 2. 5. Efectos en la salud reproductiva

Diversos estudios han identificado asociaciones entre la exposición a PFHxS y consecuencias reproductivas negativas, tanto en hombres como en mujeres.

El incremento en los niveles séricos de PFHxS está relacionado con una disminución de la calidad espermática, incrementando considerablemente la proporción de células morfológicamente anormales. La proporción de espermias normales disminuye 35% en el tercil más alto, comparado con el primero. Las concentraciones medias de PFHxS en suero fueron 2.2, 1.2 y 0.3 ng/mL, para la población groenlandesa, polaca y ucraniana, respectivamente (Toft et al., 2012).

Respecto a su efecto sobre la función de receptores de hormonas sexuales, se ha demostrado que el PFHxS es capaz de inducir la transactivación del receptor de estrógenos (RE), en células MVLN (derivadas de carcinoma mamario) y antagonizar la actividad del receptor de andrógenos, en forma dependiente de la concentración, en células CHO-K1 (derivadas de carcinoma ovárico). Cabe señalar que, como lo describen los autores, la disrupción de vías de señalización del RE podría derivar en infertilidad o cánceres dependientes de hormonas, ya que actúa como un factor de transcripción inducible por ligando que regula genes involucrados en la proliferación y diferenciación celular (Kjeldsen & Bonefeld-Jørgensen, 2013).

Con relación al desarrollo de algunas patologías reproductivas, se ha demostrado que altos niveles de PFHxS se asocian con un incremento en el riesgo de insuficiencia ovárica prematura. Asimismo, niveles elevados de este compuesto se han asociado con ciclos menstruales irregulares, cambios en la duración de los ciclos e hipomenorrea. Además, la exposición prenatal a PFHxS ha sido asociada con un incremento en la concentración sérica de testosterona en adolescentes, lo que potencialmente podría desencadenar en síndrome de ovario poliquístico, que a su vez es asociado con disrupción de la función reproductiva (Maisonet et al., 2015; S. Zhang et al., 2018; W. Zhou et al., 2017).

Finalmente, en cuanto a fertilidad se refiere, un estudio demostró que la exposición a PFHxS, puede reducir la fecundabilidad e incrementar la probabilidad de infertilidad femenina (Vélez et al., 2015).

1. 3. La maduración del ovocito

La fertilidad femenina depende, en gran medida, de la maduración gamética. La maduración del ovocito es un proceso, mediante el cual, éste completa la primera división meiótica y experimenta algunos cambios citoplasmáticos, adquiriendo así la capacidad de ser fertilizado (Mehlmann, 2005)

Este proceso comprende dos aspectos: la maduración citoplasmática y la maduración nuclear, las cuales ocurren paralelamente. La maduración citoplasmática incluye cambios en el perfil de expresión de proteínas del ciclo celular, reubicación de los organelos citoplasmáticos, modificaciones transcripcionales del mRNA, alteración de la permeabilidad de la membrana y diferenciación de la maquinaria de señalización del calcio. La maduración nuclear involucra el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD, por sus siglas en inglés), la condensación y segregación cromosómica (metafase I: MI) y la extrusión del cuerpo polar (metafase II: MII) (Leoni et al., 2015).

1. 3. 1. El cAMP en la maduración del ovocito

La adquisición de la capacidad del ovocito para salir del arresto meiótico y progresar hacia la metafase II es conocida como competencia meiótica y es adquirida antes del pico de hormona luteinizante (LH) a mitad del ciclo ovulatorio; durante esta etapa, el ovocito sintetiza proteínas que promueven la maduración, entre ellas, cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y ciclinas. Sin embargo, es hasta que se alcanza el pico de LH, que el ovocito sale del arresto meiótico, un proceso dependiente de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), cuyos niveles regulan la actividad del complejo proteico CDK1/Ciclina B, también conocido como factor promotor de la maduración (FPM) y por ende, el arresto o reanudación de la meiosis (Conti et al., 2002; Mehlmann, 2005).

El cAMP puede ser producido por el ovocito en sí o por las células de la granulosa que lo rodean. El cAMP producido por las células de la granulosa, difunde hacia el ovocito a través de uniones comunicantes o en hendidura (*gap*), mientras que, en el ovocito, la producción de

cAMP es mediada por receptores acoplados a proteínas G en la membrana plasmática, que estimulan a G_s y subsecuentemente a la adenililciclasa (AC). Por otro lado, las altas concentraciones de cAMP, son mantenidos por acción de la fosfodiesterasa específica de cAMP (PDE3), que es inhibida por cGMP, derivado de las células granulosas del *cumulus*, que entran al ovocito vía uniones *gap* (Figura 2A) (Mehlmann, 2005; Richard & Baltz, 2014).

Altos niveles de cAMP inducen, vía proteína cinasa A (PKA), la fosforilación de CDK1, manteniendo al FPM inactivo (Figura 2A) y, por el contrario, la disminución de cAMP conduce a la desfosforilación de CDK1, activando al FPM, permitiendo así la reanudación de la meiosis (Figura 2B) (Mehlmann, 2005).

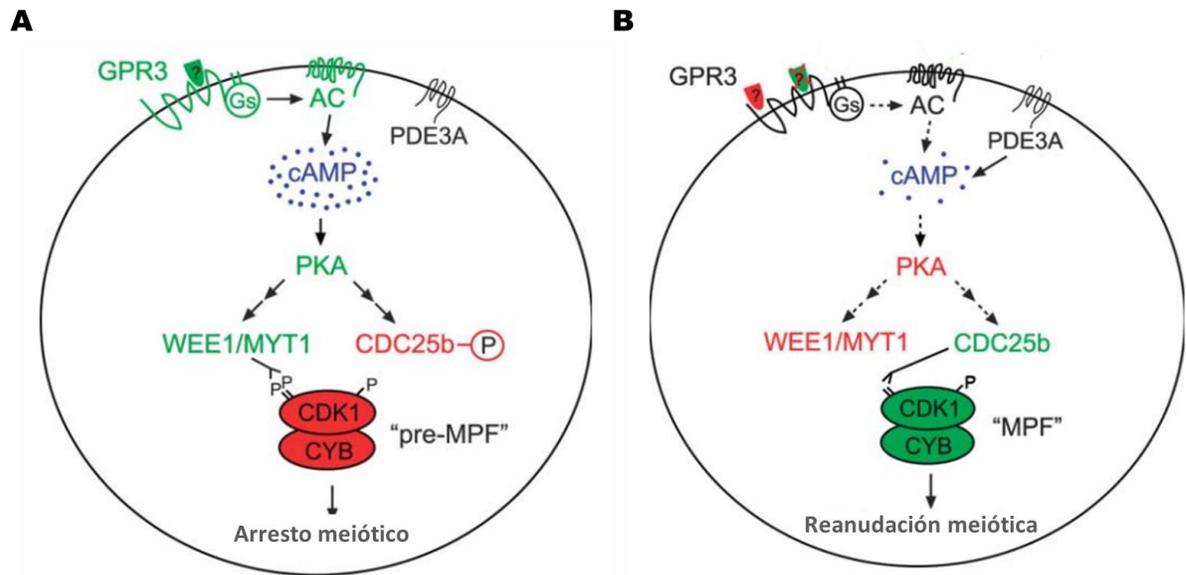


Figura 2. Señalización celular que conduce al arresto o a la reanudación de la meiosis.

A) Mantenimiento del arresto meiótico. El receptor GPR3, activado constitutivamente o por algún ligando desconocido de las células foliculares, activa a G_s , la cual estimula a AC causando la elevación de cAMP. El cAMP activa a PKA, que, por una parte, induce la fosforilación de la fosfatasa CDC25b (CDC25b-P), inactivándola, y por otra, estimula la actividad de la quinasa WEE1/MYT1 que fosforila a CDK1 para mantenerla inactiva, lo cual finalmente resulta en la regulación del complejo CDK1/ciclina B y mantiene el arresto meiótico. PDE3A evita la degradación de cAMP manteniendo altos niveles de éste en el ovocito. B) Reanudación de la meiosis. La inhibición de la producción de cAMP, induce la desfosforilación de CDK1, vía CDC25b, activando así al FPM e induciendo la reanudación meiótica (modificada de Mehlmann, 2005).

1. 3. 2. Las células del *cumulus* en la maduración del ovocito

Durante el proceso de maduración, las células del *cumulus* (CCs) juegan un papel de suma importancia: mantienen el arresto meiótico, participan en la inducción de la reanudación meiótica y soportan la maduración citoplasmática (Tanghe et al., 2002).

El arresto meiótico es mantenido, en parte, por la transferencia directa de moléculas desde el *cumulus* hacia el ovocito, algunas de las cuales pueden tener un efecto inhibitorio de la meiosis. Se ha sugerido, por ejemplo, que el cAMP en las CCs promueve la activación de factores que inhiben la maduración, mismos que se mantienen activos por procesos dependientes de cAMP, en el ovocito. Asimismo, como se mencionó en el apartado anterior, el nivel de cAMP controla el arresto o reanudación de la meiosis, y el papel que juegan las CCs en este proceso es tan relevante, que las sustancias que incrementan los niveles de cAMP solo mantienen el arresto meiótico en ovocitos rodeados por CCs y no en ovocitos desnudos (Tanghe et al., 2002).

Por otra parte, las CCs responden a la señal de LH incrementando los niveles intracelulares de Ca^{2+} , el cual es difundido hacia el ovocito vía uniones *gap*. El incremento de este ion induce la disrupción de uniones *gap*, un mecanismo que antecede a la expansión del *cumulus*, un buen indicativo de maduración. Además, el Ca^{2+} podría inhibir la actividad de la AC, reduciendo la producción de cAMP y finalmente induciendo la reanudación meiótica, tal como lo muestra la Figura 2B (Mehlmann, 2005; Tanghe et al., 2002).

Además, las CCs juegan un papel protector y metabólico durante la maduración citoplasmática: protegen al ovocito de estrés oxidante al regular los niveles de GSH (glutación) intracelular, metabolizan glucosa a piruvato, el cual soporta la maduración y mantienen una baja tensión de oxígeno, lo cual resulta benéfico para la maduración (Tanghe et al., 2002).

Remarcando la importancia de las CCs, es necesario mencionar que diversos autores han sugerido que estas células podrían ser utilizadas como biomarcadores de calidad del ovocito y, por ende, potenciales predictores de fertilidad femenina. A este respecto se ha propuesto que, entre otros parámetros, el estado del DNA en las CCs podría ser un indicador de la competencia del ovocito y el subsecuente desarrollo embrionario (Barcena et al., 2015).

1. 3. 3. Las uniones *gap* en la maduración del ovocito

Como se ha mencionado, la comunicación entre las CCs y el ovocito es sumamente importante y mediada, principalmente, por uniones *gap*, a través de las cuales, son transferidas una gran cantidad de moléculas, incluyendo nucleótidos, aminoácidos y algunos metabolitos, así como iones. De este modo, la comunicación intercelular mediada por uniones *gap* (GJIC, por sus siglas en inglés) es imprescindible para el crecimiento y el control de la maduración del ovocito (Sasseville et al., 2009; Thomas et al., 2004).

Diversos estudios señalan que, para mantener el arresto meiótico, es necesario que las uniones *gap* sean funcionales, asegurando así la transferencia de cAMP hacia el ovocito. Tras el pico de LH, se produce una disrupción de uniones, lo que disminuye el aporte de cAMP, induciendo el reinicio de la meiosis (Richard & Baltz, 2014; Sela-Abramovich et al., 2006).

Aunque existen varias teorías acerca del origen del cAMP, estudios *in vivo* e *in vitro* han confirmado que la regulación a la baja del suministro de este segundo mensajero, proveniente de las CCs, mediante uniones *gap*, es un factor causal para la reanudación meiótica. Tal hallazgo fue demostrado tras la exposición a carbenoxolona, un bloqueador de uniones *gap*, que indujo la salida del arresto meiótico, acompañada por una disminución intra-ovocito de cAMP, que pudo ser revertida por inhibición de fosfodiesterasas (Sela-Abramovich et al., 2006).

Además, se ha demostrado que la disrupción de uniones *gap* coincide con el GVBD, una característica morfológica de la reanudación meiótica (Sasseville et al., 2009).

Por otro lado, Zhou et al. (2016), sugirieron que las uniones *gap* son necesarias para la maduración efectiva del ovocito. El estudio demostró que los COCs con uniones *gap* intactas tienen altas tasas de maduración nuclear, sin embargo, comparado con estos, el porcentaje de ovocitos que alcanzan la MII, es menor en ovocitos desnudos co-cultivados con CCs (sin uniones *gap*) y en ovocitos desnudos cultivados en ausencia de CCs.

Asimismo, Domínguez et al. (2016, 2019), sugirieron que la disrupción de la GJIC durante las primeras horas de maduración podría estar asociada con una disminución del número de ovocitos que logran salir del arresto meiótico.

1. 3. 4. La función mitocondrial en la maduración del ovocito

Durante el proceso de maduración, la mitocondria juega un papel importante, proveyendo el ATP necesario para cubrir la demanda energética y para la síntesis y fosforilación de proteínas, regulando el estado redox citoplasmático, contribuyendo a la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma y sirviendo como reservorio de este mismo ion y de factores proapoptóticos (Leoni et al., 2015; Russo et al., 2014; Wang et al., 2009).

Las características y la función de la mitocondria se relacionan directamente con la calidad y la competencia del ovocito, de tal forma que, disfunciones mitocondriales, tales como anomalías espaciales, estructurales y genéticas pueden tener un impacto significativo en el proceso de maduración y en el posterior desarrollo del embrión (Russo et al., 2014; Wang et al., 2009).

Una de las principales funciones de la mitocondria en la maduración, es cubrir la demanda energética del ovocito. Durante este proceso, incrementan los requerimientos de ATP y Ca^{2+} , lo cual se logra mediante una redistribución de mitocondrias activas. El rompimiento de la envoltura nuclear, algunos procesos de maduración meiótica, tales como la formación del huso, el mantenimiento de los estadios metafásicos y la extrusión del primer cuerpo polar, necesitan un aporte apropiado de ATP, que va acompañado con cambios en la distribución de las mitocondrias, sugiriendo que la actividad mitocondrial se adapta a la demanda metabólica. En concordancia con tal demanda de ATP, se ha demostrado que la actividad mitocondrial de los ovocitos en MI y MII incrementa, en comparación con el estadio de vesícula germinal. (Al-Zubaidi et al., 2019; S.-K. Lee et al., 2014; Russo et al., 2014; Wang et al., 2009).

La síntesis de ATP depende de la estabilidad del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$). La disminución del $m\Delta\psi$ conduce a la pérdida del gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial, lo cual bloquea la síntesis de ATP (S.-K. Lee et al., 2014; Wang et al., 2009; D. Zhang et al., 2017).

Estudios demuestran que, durante la maduración, hay un incremento en el $\Delta\psi_m$ y en ausencia de este incremento, el potencial de desarrollo del ovocito se ve afectado negativamente. Dicho incremento, comienza con el GVBD, indicando que los cambios dependientes de la maduración en el $m\Delta\psi$ son una característica importante de una maduración exitosa del ovocito (Al-Zubaidi et al., 2019; S.-K. Lee et al., 2014).

2. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado, uno de los PFCs más abundantes, tanto en el ambiente como en el organismo humano, es el PFHxS. Este compuesto sigue siendo ampliamente utilizado, a pesar de su asociación con diversas patologías, incluyendo trastornos de la función reproductiva.

Algunos estudios han propuesto una asociación entre la exposición a PFHxS y efectos adversos en la capacidad fértil. Los resultados demuestran que este compuesto afecta un importante indicador de fertilidad masculina, la calidad del semen (Huang et al., 2019; Toft et al., 2012). En lo que respecta a la fertilidad femenina, un estudio reveló que, por cada incremento de una desviación estándar en la concentración sérica de este compuesto, la fecundabilidad se reduce un 9% y la posibilidad de infertilidad aumenta un 27% (Vélez et al., 2015). Además, se ha demostrado una asociación entre concentraciones elevadas de PFHxS en fluido folicular y algunos factores etiológicos de infertilidad (Kim et al., 2020).

Aunque las causas exactas que subyacen estos efectos no han sido descritas, se ha sugerido que este compuesto podría interferir en la función reproductiva, induciendo alteraciones en la calidad de los gametos, que impidan que estos adquieran su capacidad de fecundar (en el caso del espermatozoide) o de ser fertilizados (en cuanto al ovocito se refiere) (Governini et al., 2011; Oseguera-López et al., 2020).

Oseguera-López et al., (2020) indicaron que, en espermatozoides de jabalí expuestos, el PFHxS es capaz de interferir en algunos procesos necesarios para la capacitación espermática (proceso mediante el cual se adquiere la capacidad de fecundar) a través de varias vías: A) Alterando la homeostasis de calcio, B) Modificando la fosforilación de tirosina en el acrosoma y en la zona ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, inhibiendo el cambio de EHZ (zona ecuatorial de la cabeza) y AZ (zona del acrosoma) al patrón AE (zona ecuatorial más acrosoma), C) Incrementando los niveles de ERO y D) Aumentando la fragmentación de DNA.

Por otra parte, aunque no hay información disponible sobre los efectos del PFHxS en el gameto femenino, que pudieran alterar su capacidad de ser fertilizado, se ha demostrado que otros PFCs son capaces de inhibir la maduración de ovocitos. A este respecto, Domínguez et. al, (2016, 2019) encontraron que, en ovocitos porcinos, dicho proceso es inhibido tras la exposición a PFOS y PFDA (Ácido perfluorodecanoico). Asimismo, estos estudios sugirieron que la disrupción de la comunicación intercelular, mediada por uniones *gap*, entre el ovocito y las células del *cumulus*, durante las primeras horas de la maduración, así como cambios en los patrones de distribución de calcio intracelular, podrían representar posibles mecanismos de acción. Por su parte, Guo et al., (2021), demostraron que la inhibición de la maduración de ovocitos de ratón inducida por exposición a PFDA, es atribuida a deficiencias en la organización y en la función mitocondrial, así como a daño al DNA y a anomalías en la morfogénesis del huso meiótico.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Será capaz el sulfonato de perfluorohexano de afectar negativamente la viabilidad y maduración *in vitro* de ovocitos porcinos?
- ¿Cuáles son los mecanismos mediante los cuales el sulfonato de perfluorohexano altera la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos?

4. HIPÓTESIS

- El sulfonato de perfluorohexano será capaz de disminuir la viabilidad y la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.
- La exposición a sulfonato de perfluorohexano inducirá alteraciones en la comunicación intercelular ovocito-*cumulus* mediada por uniones *gap*, en la función mitocondrial del ovocito y/o en la integridad del DNA de las células del *cumulus*, alterando así la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.

5. OBJETIVOS

5. 1. Objetivo general

Analizar el efecto del sulfonato de perfluorohexano sobre la viabilidad y maduración de los ovocitos porcinos *in vitro*, así como evaluar posibles mecanismos de acción.

5. 2. Objetivos particulares

- Evaluar la viabilidad de ovocitos porcinos después de ser expuestos a sulfonato de perfluorohexano.
- identificar cambios en la maduración de ovocitos porcinos tras la exposición al sulfonato de perfluorohexano.
- Determinar el efecto del sulfonato de perfluorohexano sobre la comunicación intercelular mediada por uniones *gap* entre el ovocito y las células del *cumulus*, durante la maduración *in vitro*.
- Establecer la acción del sulfonato de perfluorohexano sobre el potencial de membrana mitocondrial de ovocitos porcinos, durante la maduración *in vitro*.
- Estimar el daño al DNA inducido por el sulfonato de perfluorohexano en células del *cumulus*, durante la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6. 1. Reactivos

A menos que se especifique, todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

6. 2. Obtención de complejos ovocito – células del *cumulus*

Los ovarios fueron obtenidos de cerdas pre-púberes provenientes del rastro “Los Arcos” y se transportaron al laboratorio en solución salina (NaCl 0.9%) a 38°C.

Los complejos ovocito – *cumulus* (COCs) se obtuvieron mediante aspiración folicular. Se puncionaron folículos ováricos de entre 3 y 6 mm de diámetro y el fluido folicular fue aspirado por vacío con jeringa de 10 mL y aguja 18G. Se permitió que el fluido sedimentara y el paquete celular resultante fue lavado con TL-HEPES-PVA. Los COCs fueron colectados bajo el microscopio estereoscópico, con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio adelgazada manualmente por exposición a la flama del mechero. Los criterios de selección de los COCs a madurar se describen en la Figura 3.

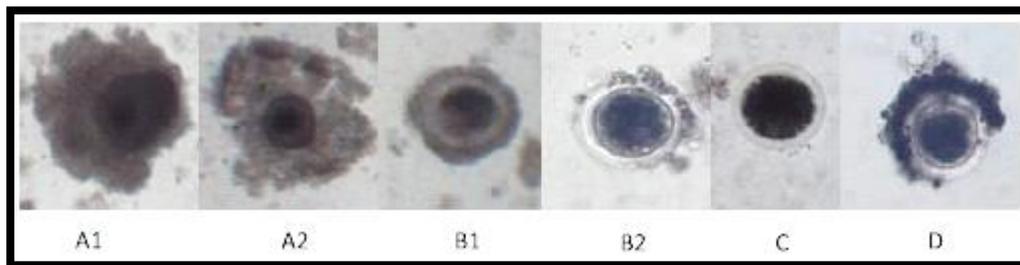


Figura 3. COCs en fresco sin teñir x40. Bajo el microscopio estereoscópico los COCs pueden clasificarse según la apariencia del *cumulus* y del ovoplasma en 6 categorías. Los COCs pertenecientes a las categorías A1, A2 y B1 fueron utilizados para la maduración *in vitro*. A1: ovocitos rodeados por un *cumulus* íntegro, denso y oscuro. A2: ovocitos rodeados por un *cumulus* íntegro, denso y claro. B1: ovocitos rodeados de forma continua por 1 o 2 capas de células del *cumulus*. B2: ovocitos con 1 o 2 capas de células del *cumulus* dispuestos de forma discontinua. C: ovocitos totalmente desnudos. D: ovocitos rodeados por un *cumulus* de células picnóticas (tomada de Lorenzo *et al.*, 2015).

6. 3. Maduración *in vitro* de ovocitos

La maduración *in vitro* (MIV) fue llevada a cabo como fue reportada previamente (Abeydeera et al., 1998), con modificaciones menores. Los COCs seleccionados fueron lavados 3 veces en medio de maduración libre de proteínas (TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio [26.2 mM], suplementado con polivinil alcohol (PVA, 0.1%), D-glucosa [3.05 mM], piruvato de sodio [0.91 mM], cisteína [0.57 mM] y EGF [10 ng/mL], LH [0.5 µg/mL] y FSH [0.5 µg/mL]) y transferidos a cajas de cultivo de 4 pozos. Se sembraron aproximadamente 30 COCs por pozo en 500 µl de TCM-199 con o sin tratamiento, según fue requerido, y se incubaron a 38.5° C, con humedad a saturación y 5% de CO₂ durante 44 h, que es el tiempo apropiado para la MIV de ovocitos porcinos. Tras este tiempo de maduración, además de la extrusión del primer cuerpo polar, se pueden observar numerosos cambios morfológicos, incluyendo la expansión completa de las células de *cumulus*, desconexión de las proyecciones transzonales y cambios en la ultraestructura de la membrana del ovocito (Suzuki et al., 2000).

6. 4. Tratamiento con PFHxS

Se preparó una solución stock [2 mM] de PFHxS (como sal potásica, pureza 98%) en DMSO al 10%. Al comienzo del período de maduración, se agregaron alícuotas de la solución stock al medio de maduración, con el fin de obtener las concentraciones deseadas en cada pozo que contenía los COCs, según el ensayo a realizar.

Para evaluar el efecto del PFHxS sobre la viabilidad las concentraciones utilizadas fueron 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 µM, según el rango de citotoxicidad reportado en otros tipos celulares (Y. J. Lee et al., 2014a; Liu et al., 2020).

Para los ensayos de maduración se usó PFHxS a una concentración final de 50, 100 y 150 µM, que corresponden a concentraciones subletales para el ovocito (según resultados de este estudio).

Para analizar los efectos de PFHxS en la comunicación intercelular y en el potencial de membrana mitocondrial, seleccionamos las concentraciones 50 y 100 µM, ya que además de ser no citotóxicas para los ovocitos, tuvieron un efecto significativo en la maduración (según resultados de este estudio).

6. 5. Evaluación de la viabilidad

La viabilidad fue evaluada tal como fue previamente reportado por Domínguez et al. (2019). Se realizaron 5 experimentos independientes con, al menos, 30 COCs por grupo.

Tras 44 h de MIV, los COCs fueron denudados mecánicamente, lavados en buffer salino de fosfatos (PBS) e incubados en Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT [0.5 mg/mL]), por 30 minutos. Las células viables, con metabolismo activo, convierten el MTT en formazano (Figura 4), un producto cristalino insoluble con un color púrpura intenso. Las células muertas, por otro lado, pierden esta capacidad y, por lo tanto, no muestran coloración púrpura, bajo el microscopio estereoscópico.

El porcentaje de viabilidad fue definido como:

$$\% \text{ Viabilidad} = [\text{N}^\circ \text{ de ovocitos vivos} / \text{N}^\circ \text{ total de ovocitos evaluados}] 100.$$

La concentración letal 50 (CL₅₀) fue calculada con el software estadístico GraphPad Prism 8.

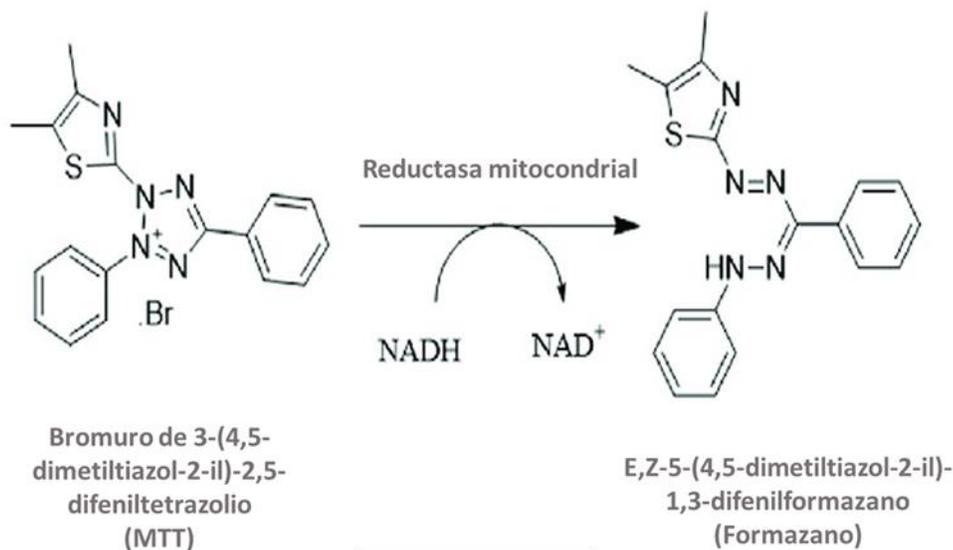


Figura 4. Conversión de MTT a cristales de formazano por enzimas reductasas mitocondriales. (tomada de Farooq et al., 2020).

6. 6. Evaluación de la maduración

La maduración fue evaluada como fue previamente reportado por Domínguez et al. (2019). Se realizaron 5 experimentos independientes con, al menos, 30 COCs por grupo. Los ovocitos desnudados fueron teñidos con bisbencimida (Hoechst 33342 [45 µg/mL]) durante 40 min, luego se lavaron con PBS, se fijaron 2 h con paraformaldehído al 2% y se montaron en PBS-glicerol (1: 9). La maduración se analizó con un microscopio de epifluorescencia. Los ovocitos en la etapa de vesícula germinal (VG) se consideraron inmaduros, aquellos en MI se consideraron en proceso de maduración y los que alcanzaron la MII se clasificaron como maduros.

El estadio de VG, se caracteriza morfológicamente por una VG intacta, la membrana nuclear y el nucleolo claramente visibles, y la cromatina formando un anillo alrededor del nucleolo. El estadio MI se define por la formación del primer huso meiótico, el núcleo no es visible y los cromosomas se alinean en la placa metafásica, en preparación para completar la primera división. El estadio MII se caracteriza por la alineación de los cromosomas homólogos en la placa ecuatorial del huso durante la metafase de la segunda división meiótica; el primer cuerpo polar es visible en el espacio perivitelino (Figura 5).

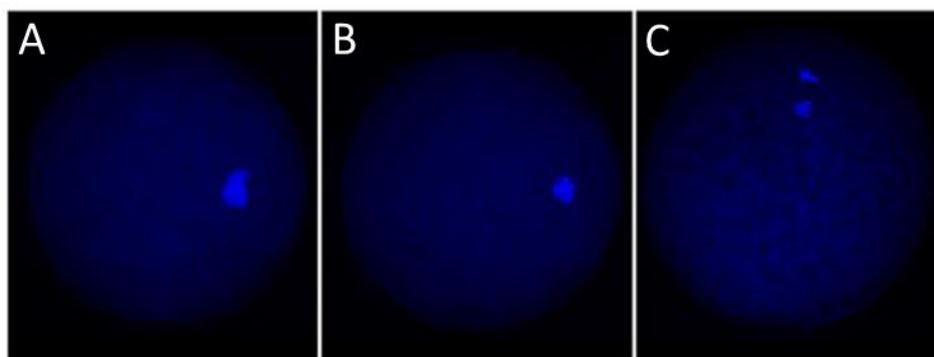


Figura 5. Microfotografías de los distintos estadios de desarrollo meiótico, evaluados por epifluorescencia con tinción con Hoechst 33342. A) VG: Vesícula germinal claramente visible; B) MI: Los cromosomas están condensados y presentes en la línea ecuatorial, C) MII: Cromosomas en el eje ecuatorial del ovocito metafásico, con el primer cuerpo polar extruido (tomada de Domínguez et al., 2019).

El porcentaje de maduración fue determinado mediante la siguiente fórmula:
% Maduración = $[\text{N}^\circ \text{ de ovocitos en MII} / \text{N}^\circ \text{ total de ovocitos evaluados}] \times 100$.

La concentración de inhibición de la maduración 50 (CIM₅₀) fue calculada con el software estadístico GraphPad Prism 8.

6. 7. Ensayo de comunicación intercelular ovocito – células del *cumulus*

El ensayo se realizó mediante la técnica de captura de calceína diseñado por Thomas et al. (2009) y adaptado a ovocitos porcinos por Sasseville et al. (2009). La calceína-AM es un compuesto no fluorescente, eléctricamente neutro y altamente lipofílico, por lo que atraviesa fácilmente las membranas. En el interior de la célula, los grupos acetoximetil éster son degradados por esterasas endógenas inespecíficas, produciendo calceína, un compuesto fluorescente y cargado negativamente que es incapaz de atravesar la membrana plasmática, pero puede difundir en células interconectadas vía uniones *gap* (Figura 6).

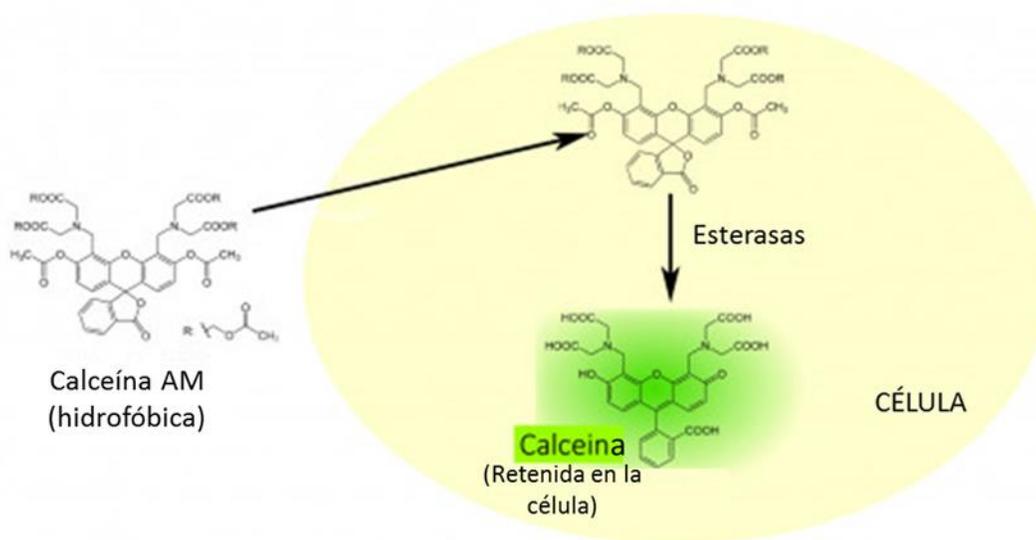


Figura 6. Conversión de calceína-AM a calceína fluorescente. Una vez que la calceína-AM se absorbe en la célula, las esterasas la convierten en calceína. Esta es capaz de formar complejos con calcio, dando como resultado una fluorescencia verde.

Seguendo el protocolo descrito por Sasseville et al. (2009), los COCs fueron cultivados habitualmente, con o sin tratamiento, según fue requerido y, tras 18 h de MIV, fueron incubados durante 15 min en una solución de calceína AM (a una concentración final de 1 μ M) para permitir la captura del colorante por las CCs. Posteriormente los COCs fueron transferidos a una solución libre de calceína y se mantuvieron un periodo de 25 min para permitir la

transferencia del colorante de las CCs hacia el ovocito. El colorante no incorporado fue removido mediante lavados con PVA. Los COCs fueron analizados bajo un microscopio confocal de fluorescencia, después de la generación de secciones ópticas. Los perfiles de intensidad de fluorescencia de calceína en ovocitos se obtuvieron con el software Zen blue lite 2.3. La intensidad de la fluorescencia en el grupo Control se fijó arbitrariamente en 1. Se realizaron tres experimentos separados, cada uno con 10 COCs por grupo.

6. 8. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$)

Los ovocitos se tiñeron con la sonda específica de potencial de membrana mitocondrial JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-imidacarbocianina), como fue reportado previamente (S.-K. Lee et al., 2014), con modificaciones menores. Los ovocitos se tiñeron con JC-1 a una concentración final de 5 μ M en una incubadora humidificada que contenía CO₂ al 5% a 38.5°C, durante 30 min. La reacción fue llevada a cabo en la oscuridad.

Se obtuvieron imágenes de las muestras en un microscopio confocal con canales de isotiocianato de fluoresceína (FITC, verde) e isotiocianato de rodamina (RITC, rojo). Se adquirieron dos imágenes fluorescentes (una verde y una roja). Las imágenes se analizaron mediante software confocal, que permite el análisis cuantitativo de la intensidad de la señal verde, correspondiente a las mitocondrias menos activadas (monómeros J) y la fluorescencia roja correspondiente a las mitocondrias activadas (agregados J) (Figura 7). Las imágenes se procesaron con el software Zen blue lite 2.3. Se calculó la proporción de RITC a FITC para cada ovocito y el cociente se usó como punto final para el $m\Delta\psi$. Se realizaron tres experimentos separados, cada uno con 10 ovocitos por grupo.

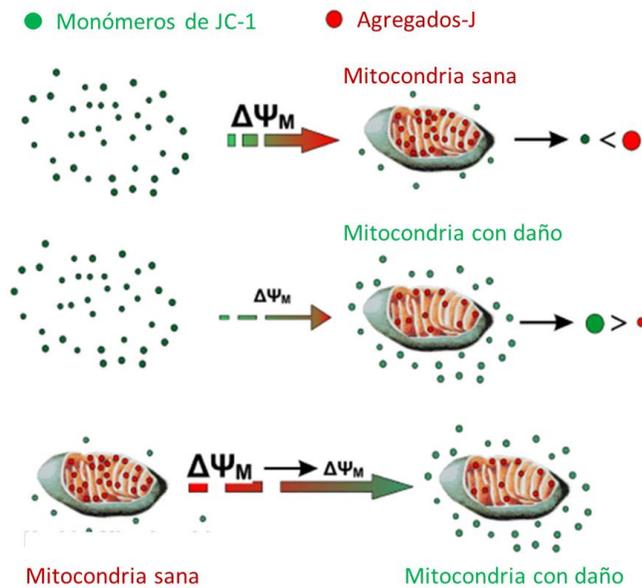


Figura 7. Ilustración esquemática que muestra la entrada de JC-1 en las mitocondrias y la generación de agregados J. JC-1, (verde) exhibe una acumulación dependiente de potencial en mitocondrias, donde comienza a formar agregados J (rojo); tras la despolarización, permanece como monómero que muestra fluorescencia verde (tomada de (Sivandzade et al., 2019)).

6. 9. Evaluación del daño al DNA en células del *cumulus*

El daño al DNA en CCs fue evaluado mediante ensayo cometa alcalino. El ensayo fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Einaudi et al (2013). Los portaobjetos de vidrio se recubrieron con una capa de agarosa de alto punto de fusión, luego, las CCs se colocaron en una gota de agarosa de bajo punto de fusión, se depositaron en la primera capa, se cubrieron inmediatamente con un cubreobjetos y se dejaron solidificar. Los portaobjetos se mantuvieron a 4°C en una solución de detergente recién preparada que contenía NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 10), Triton X-100 al 1% y DMSO al 10%, durante 90 minutos para la lisis celular. Los portaobjetos se transfirieron a una unidad de electroforesis horizontal para desenrollar el ADN, que se indujo con una solución alcalina (Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300 mM) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizó la electroforesis durante 20 minutos (25 V, 300 mA) en la misma solución tampón. Después de la electroforesis, los portaobjetos se neutralizaron tres veces con Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5), se enjuagaron con agua ultrapura, se sumergieron en metanol al 100% y se secaron durante la noche a temperatura ambiente. La tinción se realizó con una solución de yoduro de propidio (0,1 mg/mL), y los portaobjetos se examinaron con un aumento de 400x bajo un microscopio de fluorescencia.

Para cada condición, al menos 100 imágenes de CCs, seleccionadas al azar y al menos 50 imágenes de CCs fueron recolectadas y analizadas con el software OpenComet. El daño al DNA fue expresado como el “*Olive tail moment*”, el cual representa el producto del porcentaje de DNA total en la cola del cometa y la distancia entre los centros de masa de las regiones de la cabeza y la cola (longitud del *tail moment*) (Figura 8).

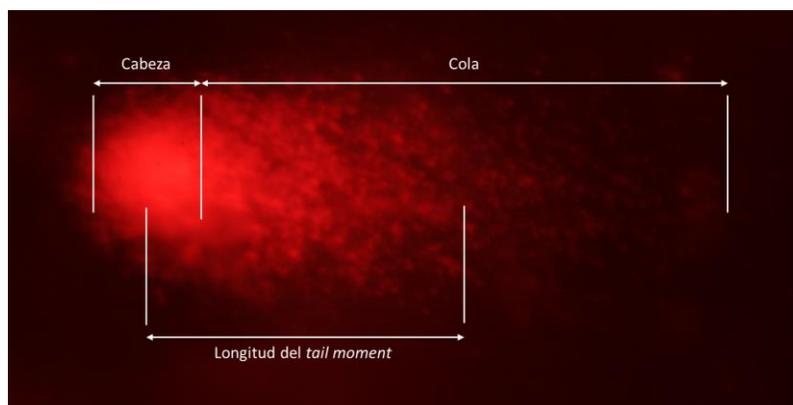


Figura 8. DNA dañado en un ensayo cometa. Se puede visualizar la cabeza y la cola del cometa, así como la longitud del “*tail moment*”.

6. 10. Análisis estadístico

El efecto del PFHxS sobre la viabilidad fue analizado mediante una regresión no lineal (exponencial) con el paquete estadístico GraphPad Prism. Los datos fueron transformados logarítmicamente, se realizó una regresión exponencial bifásica: con una fase de meseta seguida de una de decaimiento, y se calculó la CL_{50} . La diferencia entre los tratamientos y el control fueron evaluadas mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

El efecto del PFHxS sobre la maduración fue analizado mediante una regresión no lineal (exponencial) con el paquete estadístico GraphPad Prism. Los datos fueron transformados logarítmicamente, se realizó una regresión exponencial y se calculó la CIM_{50} . La diferencia entre los tratamientos y el control fueron evaluadas mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. El nivel de confianza en todos los casos fue igual o mayor al 95% ($p < 0.05$).

7. RESULTADOS

7. 1. Efecto citotóxico del PFHxS

Se evaluó el efecto de varias concentraciones de PFHxS (50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 μM) sobre la viabilidad de los ovocitos tras 44 h de MIV. Los resultados muestran una fase de meseta (en 50 y 100 μM) seguida de una fase de decaimiento (≥ 150 μM). Hasta la concentración de 150 μM , más del 90% de los ovocitos fueron viables, es decir, el compuesto no tiene actividad citotóxica. En la fase de decaimiento, la viabilidad disminuye significativamente en forma dependiente de la concentración, desde 84% en ovocitos expuestos a la concentración de 200 μM , hasta llegar al 16% en la concentración máxima estudiada (Figura 9).

La CL_{50} calculada de PFHxS fue 329.1 μM (intervalo de confianza 95%: 296.5 a 365.5).

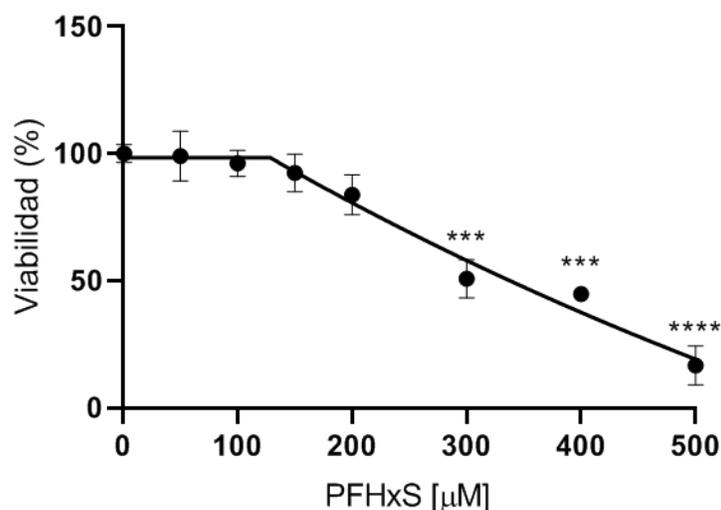


Figura 9. Viabilidad de ovocitos porcinos expuestos a PFHxS durante la MIV. A concentraciones superiores a 100 μM , la viabilidad de ovocitos porcinos expuestos a PFHxS disminuye en forma dependiente de la concentración. La gráfica muestra el promedio \pm SD de 5 experimentos independientes con aproximadamente 30 ovocitos por grupo por experimento. La línea representa la regresión exponencial. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo Control (*** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$).

7. 2. Concentraciones subletales de PFHxS inhiben la maduración *in vitro*

Para evitar que el efecto observado sobre la maduración pudiera ser atribuido a muerte celular previa al GVBD, los ensayos fueron llevados a cabo con concentraciones subletales de PFHxS tras 44 horas de exposición.

Se observó una asociación negativa entre los porcentajes de maduración y la concentración de PFHxS a la que fueron expuestos los COCs (Figura 10). El efecto la progresión de la meiosis se detalla en la Tabla 3.

La CIM₅₀ fue calculada en 91.68 μM de PFHxS (Intervalo de confianza 95%: 80.87 a 103.9 μM).

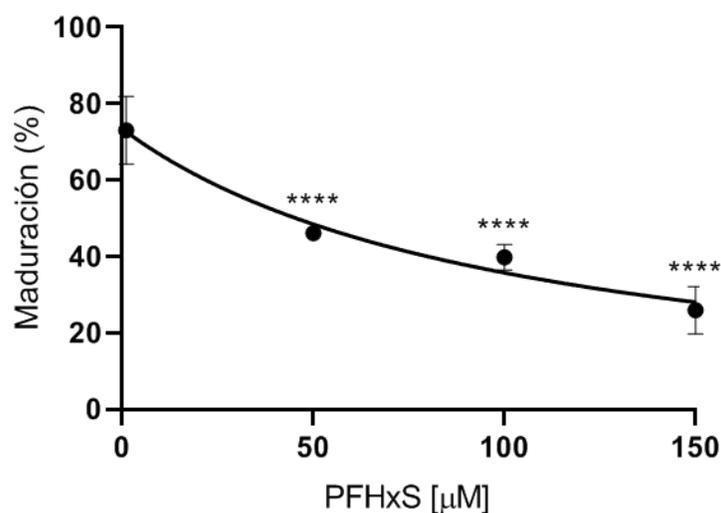


Figura 10. Efecto de la exposición a PFHxS en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos. La maduración de ovocitos es inversamente correlacionada con la concentración de PFHxS. La gráfica muestra el promedio \pm SD de 5 experimentos independientes con aproximadamente 30 ovocitos por grupo y experimento. Los resultados son expresados como el porcentaje de maduración con respecto al grupo Control. La línea representa la regresión exponencial. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al Control (**** $p < 0.0001$).

Tabla 3. Efecto del PFHxS en la progresión meiótica en ovocitos porcinos in vitro

TRATAMIENTO	ETAPA DE MADURACIÓN (%)		
	GV	MI	MII
CONTROL	5	22	73
PFHxS [50 µM]	12	41**	47****
PFHxS [100 µM]	39****	22	39****
PFHxS [150 µM]	52****	23	25****

*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al Control (**p<0.005, ****p<0.0001)

7. 3. El PFHxS no afecta la comunicación intercelular en COCs

La GJIC entre las CCs y el ovocito, fue evaluada tras 18 h de MIV, tiempo en el cual, el ovocito porcino alcanza el nivel máximo de captura de calceína, según lo reportado por Sasseville et. al. (2009). Se usó carbenoxolona (CBX) [100 µM] como control positivo de inhibición de uniones *gap*. Las concentraciones utilizadas para el ensayo fueron las equivalentes a la CIM₅₀ y un medio de esta concentración, dado que estas concentraciones mostraron ser no citotóxicas (Figura 9) para el ovocito, pero mostraron un efecto significativo en un evento celular importante: la maduración (Figura 10).

CBX inhibió la GJIC, impidiendo la transferencia de calceína desde las CCs al ovocito. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la captura de calceína en COCs tratados con PFHxS con respecto a aquellos del grupo Control (Figura 11). En la figura 12 se muestran imágenes representativas del efecto del PFHxS sobre la GJIC en COCs.

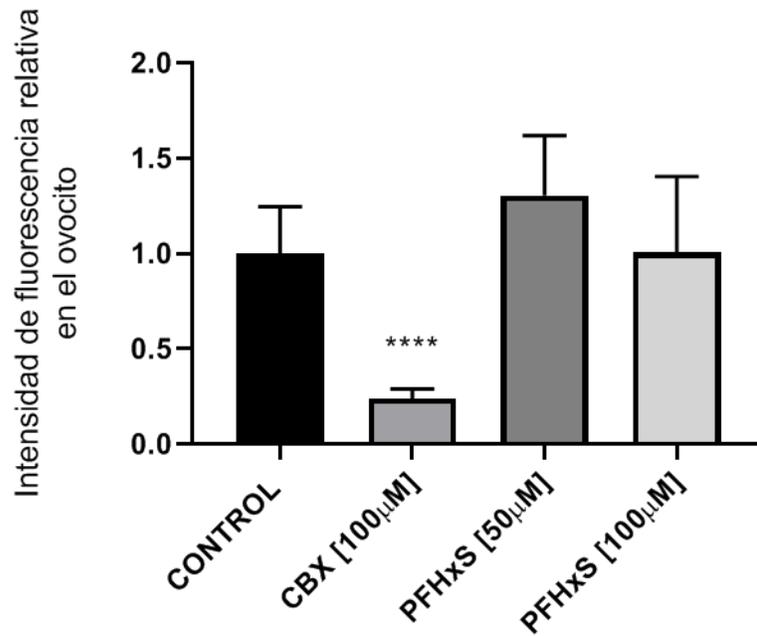


Figura 11. Efecto de la exposición a PFHxS sobre la captura de calceína en el ovocito. La GJIC no fue afectada significativamente en los COCs después de 18 h de exposición a PFHxS. La gráfica muestra la intensidad de fluorescencia relativa intra-ovocito. Cada columna representa el promedio \pm SD de 3 experimentos independientes en cada uno de los cuales se analizaron al menos 10 COCs. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo Control (**** $p < 0.0001$).

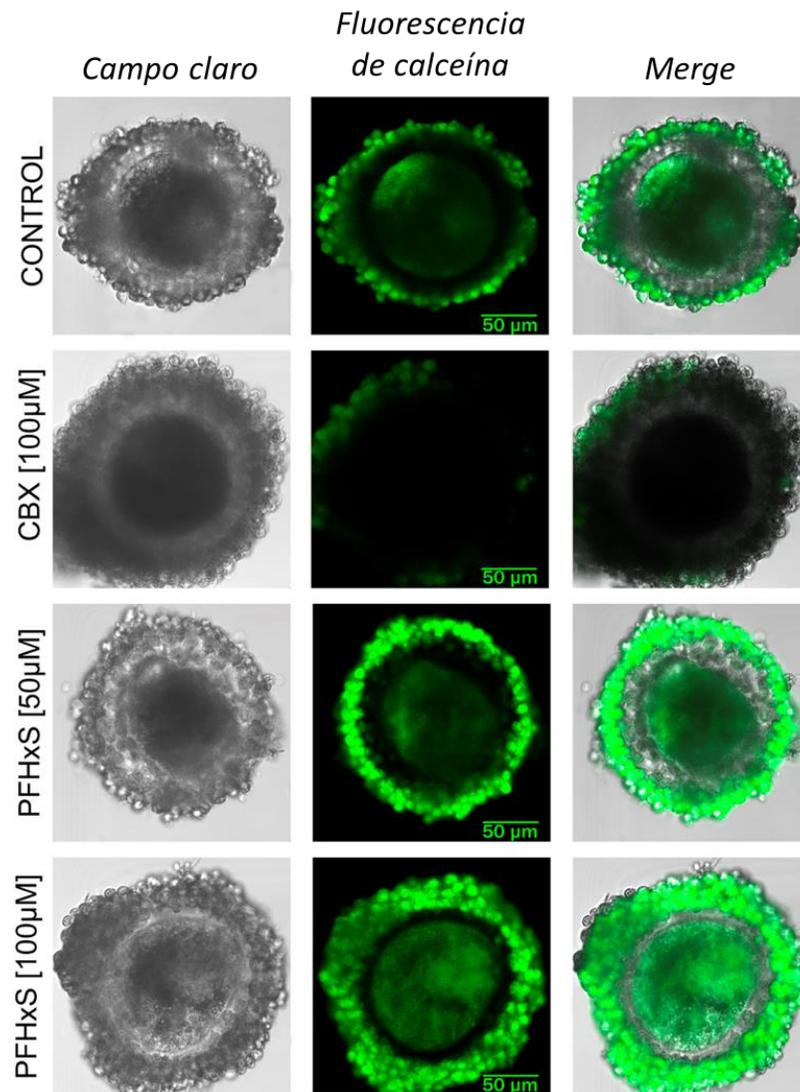


Figura 12. Captura de calceína en COCs expuestos a PFHxS. Se midió el diámetro del ovocito y la intensidad de fluorescencia intra-ovocito fue calculada por unidad de área. Se muestran secciones ópticas generadas por microscopía confocal (400X).

7. 4. El PFHxS modifica el $m\Delta\Psi$ del ovocito a las 18 h de MIV

La actividad mitocondrial fue evaluada en ovocitos expuestos a concentraciones no citotóxicas de PFHxS (50 and 100 μM), tras 18 y 44 h de MIV. El $m\Delta\Psi$ en los ovocitos del grupo Control fue elevado en el estadio de rompimiento de la vesícula germinal (18 h de MIV) y disminuyó en MII (44 h de MIV). Tras 18 h de MIV, el $m\Delta\Psi$ fue significativamente reducido en ovocitos tratados con PFHxS, respecto a los ovocitos del grupo Control, mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas a las 44 h (Figura 13). Imágenes representativas del $m\Delta\Psi$ en ovocitos a las 18 y 44 h de MIV son presentadas en la figura 14.

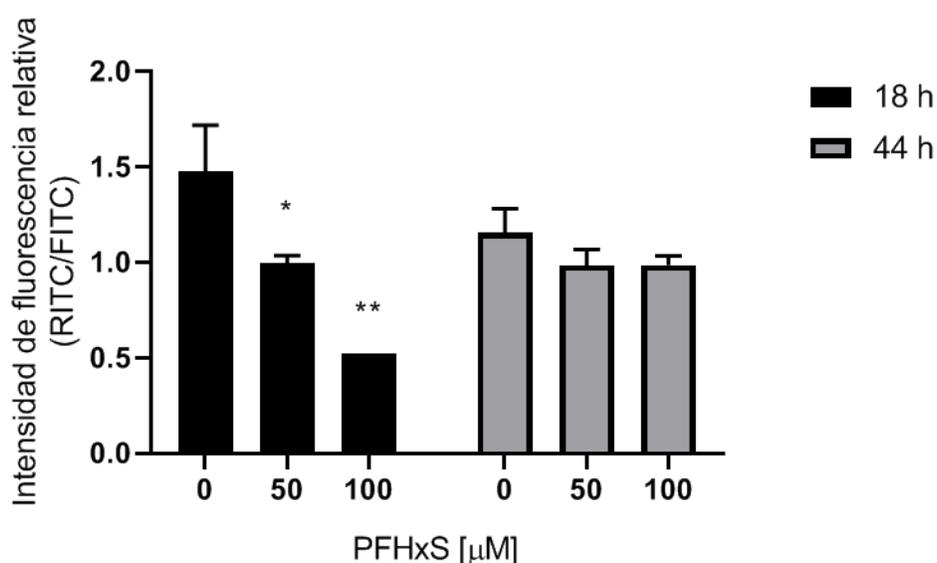


Figura 13. Efecto de la exposición a PFHxS en el potencial de membrana mitocondrial después de 18 y 44 h de MIV. A las 18 h, el PFHxS puede inducir una despolarización de la membrana mitocondrial en forma dependiente de la concentración. Mientras que no se observaron cambios en el $m\Delta\Psi$ a las 44 h. La gráfica muestra la intensidad de fluorescencia relativa. Cada columna representa la media \pm SD de 3 experimentos independientes con al menos 10 COCs analizados por grupo, por tratamiento. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al Control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

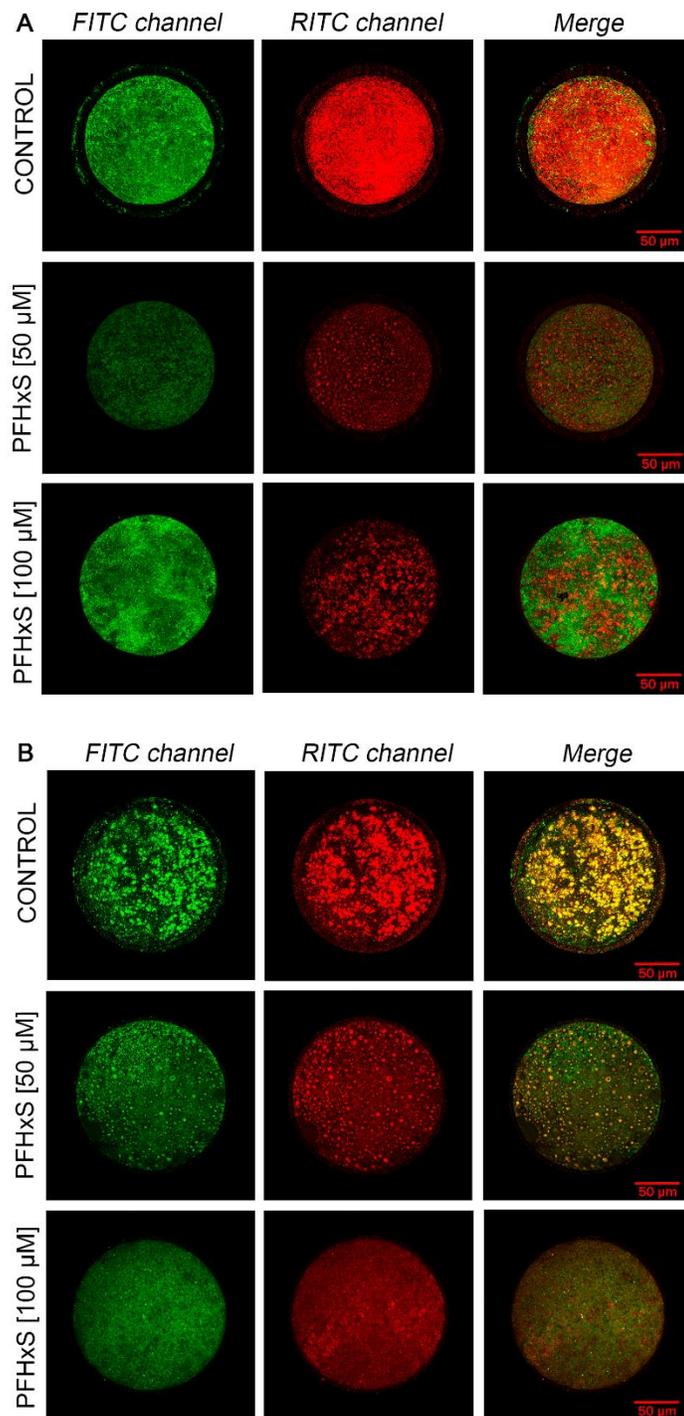


Figura 14. Potencial de membrana mitocondrial en ovocitos expuestos a PFHxS. La fluorescencia verde corresponde a mitocondrias menos activadas (monómeros J) y la fluorescencia roja corresponde a mitocondrias activadas (agregados J). A) Efectos sobre el $m\Delta\Psi$ a las 18 h de MIV. B) Efectos sobre el $m\Delta\Psi$ a las 44 h de MIV. Se muestran secciones ópticas generadas por microscopía confocal (400X).

7. 5. El PFHxS induce daño al DNA en células del *cumulus*

Dado que el efecto del PFHxS sobre la maduración del ovocito podría ocurrir indirectamente alterando las actividades de las células que lo rodean, las cuales soportan el crecimiento y maduración del ovocito se usó el ensayo cometa alcalino para determinar si el PFHxS podía causar fragmentación del DNA en CCs. Se evaluó el efecto genotóxico del PFHxS en CCs a las 44 h de MIV. Para los ensayos, los COCs fueron expuestos a concentraciones que resultaron subletales para el ovocito (Figura 9). Los resultados muestran una tendencia a incrementar el daño al DNA en tanto la concentración de PFHxS es mayor (Figura 15). Imágenes representativas de cada tratamiento son mostrados en la figura 16.

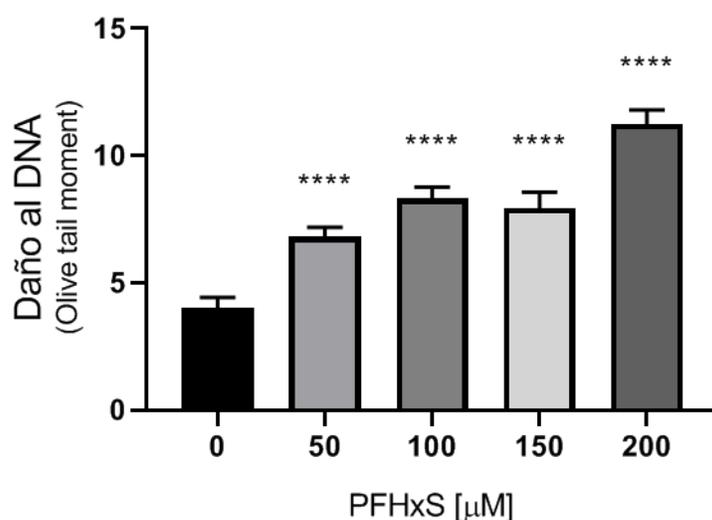


Figura 15. Daño al DNA en células del cumulus expuestas a PFHxS durante la MIV. El PFHxS indujo daño al DNA en CCs después de 44 h de exposición. Cada columna representa la media \pm SD de tres experimentos independientes en cada uno con al menos 50 CCs analizadas por grupo y experimento. *Diferencia estadísticamente significativa relativa al control (**** $p < 0.0001$).

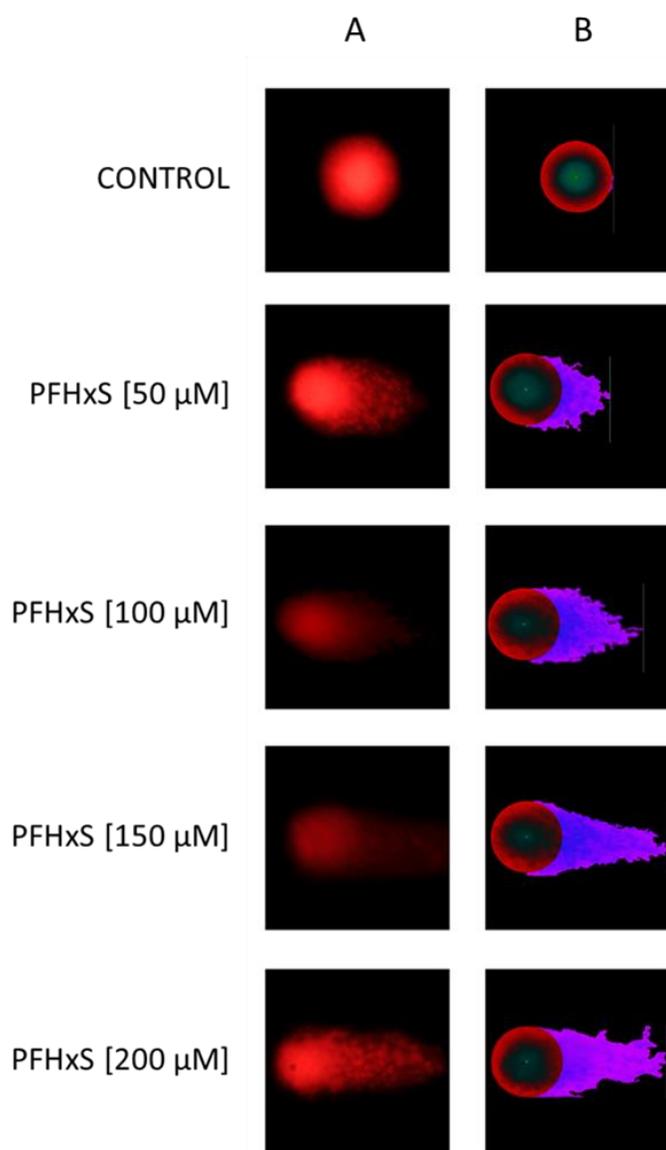


Figura 16. Cometas de CCs después de la exposición a PFHxS. A) Imágenes originales de cometas. B) Imágenes de cometas analizados por CASP (CASO, Wrocław, Poland).

8. DISCUSIÓN

La información epidemiológica sustenta una asociación entre la exposición a PFHxS y alteraciones en la fertilidad femenina, sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados continúan siendo desconocidos (Vélez et al., 2015).

En un esfuerzo por dilucidar esta relación, se ha investigado si el ovocito puede ser blanco de la acción de PFCs. A este respecto, Governini et al. (2011) reportaron que la presencia de estos compuestos en fluido folicular es asociada con una disminución significativa en las tasas de fertilización, en mujeres sometidas a protocolos de reproducción asistida.

La capacidad de fertilización del ovocito es adquirida durante la maduración, por lo que los estudios en nuestro laboratorio se han centrado en este proceso para investigar el efecto de los PFCs en la salud reproductiva. En este sentido, recientemente se demostró que el PFOS y el PFDA inhibieron la viabilidad y la maduración de ovocitos porcinos cultivados *in vitro* (Domínguez et al., 2016, 2019).

En el presente estudio, la viabilidad de los ovocitos fue afectada negativamente tras la exposición a PFHxS ($CL_{50}= 329.1 \mu\text{M}$). Otros estudios, llevados a cabo en células neuronales, mostraron que la concentración citotóxica de este compuesto oscila entre los 100 y 500 μM y que tras la exposición a PFHxS se reduce la viabilidad en forma dependiente de la concentración (Y. J. Lee et al., 2014a). El mismo efecto fue observado en células madre mesenquimales humanas, en las cuales la viabilidad disminuyó significativamente después de 24 y 48 horas de exposición a PFHxS, mostrando una CL_{50} de 267.1 y 223.1, respectivamente (Liu et al., 2020). El efecto citotóxico causado por PFHxS observado en el presente estudio en ovocitos porcinos, es significativamente más bajo que el de otros PFCs, tales como PFOS ($CL_{50}= 32 \mu\text{M}$), and PFDA ($CL_{50}= 7.8 \mu\text{M}$), en el mismo modelo de estudio (Domínguez et al., 2016, 2019).

Además, el porcentaje de ovocitos que lograron el rompimiento de la vesícula germinal y alcanzaron la metafase II se vio reducido en forma dependiente de la concentración después de la exposición a concentraciones subletales de PFHxS ($CIM_{50}=91.68 \mu\text{M}$). Estudios previos, usando el mismo modelo de estudio reportaron una CIM_{50} de 22 μM para PFOS y 3.8 μM para PFDA (Domínguez et al., 2016, 2019). Esto muestra que el PFHxS no solo tiene un impacto

significativamente menor en la viabilidad de los ovocitos que el PFOS y el PFOA, sino también en la maduración de los ovocitos.

Inesperadamente, el PFHxS provocó la detención de ovocitos en la etapa de VG a concentraciones más altas (100 y 150 μM), sin embargo, a la concentración más baja probada (50 μM), los ovocitos pudieron llevar a cabo la ruptura de la vesícula germinal, pero se detuvieron en MI. Este arresto de los ovocitos en MI no se había observado en estudios anteriores con otros PFCs en el mismo modelo porcino, donde se encontró que PFOS y PFDA causaron el arresto de ovocitos exclusivamente en la etapa de VG (Domínguez et al., 2016, 2019). Sería muy interesante estudiar los mecanismos celulares y moleculares responsables de la detención de ovocitos en las etapas VG y MI inducida por PFHxS. Sin embargo, el impacto deletéreo de este PFC sobre la maduración de los ovocitos se mantiene, independientemente de si la inhibición se realiza en las etapas VG o MI.

Algunos estudios han reportado que la toxicidad de los PFCs está correlacionada con la longitud de la cadena perfluorada (Hu et al., 2002; Kleszczyński et al., 2009; Liu et al., 2020). Nuestros resultados concuerdan con tales estudios. En el caso particular de los ovocitos porcinos, el PFOS (8 carbonos) mostró ser aproximadamente 10 veces más potente que el PFHxS (6 carbonos) para reducir la viabilidad de los ovocitos, mientras que el PFDA (10 carbonos) fue más de 40 veces más potente. Con relación a la inhibición de la maduración de los ovocitos, PFOS y PFDA fueron aproximadamente 4 y 24 veces más potentes que PFHxS, respectivamente. La toxicidad de los PFCs se basa también en su grupo funcional; a este respecto, un estudio sobre células mesenquimales mostró que los sulfonatos perfluorados son más citotóxicos que el correspondiente carboxilato perfluorado (Liu et al., 2020). Sin embargo, no se evaluó la citotoxicidad de PFHxA en ovocitos porcinos, por lo que no podemos confirmar este hallazgo por ahora.

Los mecanismos celulares por los cuales los PFCs son capaces de inhibir la maduración de los ovocitos aún no se comprenden completamente. Un estudio en células epiteliales de hígado de rata (línea celular WB-F344) mostró que el PFHxS es capaz de inhibir la GJIC, con una concentración efectiva media (CE_{50}) de 121.5 μM , mientras que el nivel sin efecto observado (NOEL) fue 50 μM . Asimismo, los valores estimados de CE_{50} y NOEL en células de riñón de delfín (línea celular CDK) fueron 85.6 μM y 25 μM , respectivamente (Hu et al., 2002). Estudios previos en ovocitos porcinos, mostraron que PFCs como PFOA y PFDA causaron

una fuerte inhibición de la GJIC en COCs, y esto, se consideró un factor importante para la inhibición de MIV observada (Domínguez et al., 2016, 2019). Sin embargo, en el presente estudio, el PFHxS no causó inhibición de la GJIC en COCs porcinos durante la MIV. Esto implica que otros mecanismos deberían ser responsables de la inhibición de la MIV por PFHxS.

Dado que la actividad mitocondrial es esencial para la maduración de los ovocitos y que las mitocondrias son blanco de acción citotóxica de algunos PFCs (Kleszczyński et al., 2009), se evaluó si el PFHxS era capaz de alterar $m\Delta\Psi$ en ovocitos porcinos. El $m\Delta\Psi$ es crítico para la maduración de los ovocitos. Algunos procesos de maduración meiótica, como el mantenimiento de la metafase o la extrusión del primer cuerpo polar, necesitan un aporte adecuado de ATP, cuya producción está regulada por $m\Delta\Psi$ (S.-K. Lee et al., 2014). Recientemente, un estudio en células de Leydig (línea celular mLTC-1) mostró que el PFHxS redujo el $m\Delta\Psi$ (Zhao et al., 2017). Sin embargo, este parámetro no fue alterado en células madre mesenquimales humanas expuestas a PFHxS, incluso a la concentración más alta probada (300 μM) (Liu et al., 2020). Con respecto al efecto de otros PFCs, se ha demostrado que la exposición a PFOA reduce significativamente el $m\Delta\Psi$ en ovocitos de ratón (Guo et al., 2021).

Los resultados del presente estudio muestran que, en los ovocitos del grupo Control, el $m\Delta\Psi$ fue alto a las 18 h de MIV (estadio GVBD) y disminuyó después de 44 h de MIV (estadio MII). Esto concuerda con un estudio anterior, en ovocitos porcinos cultivados *in vitro*, seleccionados por su actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Egerszegi et al., 2010), pero difiere de los experimentos *in vivo* en la misma especie (Torner et al., 2004), que muestran una correlación positiva de la actividad mitocondrial con el progreso meiótico y la tasa de expansión del *cumulus*. El elevado $m\Delta\Psi$ en los ovocitos del grupo Control, a las 18 h de MIV, observado en el presente estudio, podría esperarse, considerando los niveles de ATP que el ovocito requiere para el GVBD, un proceso altamente demandante de energía (Egerszegi et al., 2010).

El estudio demuestra, además, que en ovocitos tratados con PFHxS, el $m\Delta\Psi$ es significativamente bajo a las 18 h de MIV, en relación con los ovocitos del grupo Control. También se observó una disminución en $m\Delta\Psi$ en los ovocitos expuestos a PFHxS a las 44 h de MIV, aunque no fue estadísticamente diferente. Estos resultados indican que la inhibición de la maduración observada en ovocitos porcinos expuestos a PFHxS *in vitro* puede deberse principalmente a la imposibilidad de los ovocitos de alcanzar los altos niveles de ATP que

requiere para el proceso de GVBD. Sin embargo, no se debe descartar que el PFHxS también podría causar alteraciones en la estabilidad, abundancia, distribución y calidad mitocondrial, lo que permite cambios compensatorios cuando las células son desafiadas (Eisner et al., 2018). Además, el $m\Delta\Psi$ se ha relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que podrían ser responsables de daño al DNA, proteínas y lípidos, y pueden resultar en disfunciones celulares progresivas y, finalmente, apoptosis (Suski et al., 2012).

Se ha descrito que la exposición *in vivo* a compuestos tóxicos se correlaciona con daño al DNA en CCs (Einaudi et al., 2013). Además, Raman et al. (2001), encontraron una asociación negativa entre la fragmentación del DNA en CCs y las tasas de fertilización, en humanos. Así, en el presente estudio, se analizó el efecto de PFHxS sobre la fragmentación del DNA en CCs, mediante el ensayo cometa alcalino, que permite la detección de rompimientos de DNA monocatenario y de doble cadena. Se encontró que el PFHxS provocó un aumento dependiente de la concentración en la fragmentación del DNA en las CCs, lo cual podría ser atribuido a un aumento de los niveles de ERO por PFHxS, como se ha informado que sucede en células de hepatocarcinoma humano (Wielsøe et al., 2015). El rompimiento de DNA doble y monocatenario generadas por PFHxS en CCs podrían haber interferido con la liberación de señales importantes para la maduración de los ovocitos, contribuyendo así a los efectos observados del PFHxS sobre la maduración de los ovocitos, tal como muestran estudios previos, en los que se determinó que la transcripción de la adenilato ciclasa 1 (*Adcy1*) incrementa en las CCs con rompimiento de doble cadena (DSB), por lo que la producción de cAMP aumenta, las CCs transfieren más cAMP al ovocito y finalmente se bloquea el GVBD. Del mismo modo, una ligera regulación a la baja de la fosfodiesterasa 3A (*Pde3a*) en los ovocitos rodeados por *cumulus* contribuyó a mantener los altos niveles de cAMP en los ovocitos, manteniendo así el arresto meiótico del ovocito en la profase I de la meiosis (Sun et al., 2015). Un estudio reciente muestra que el dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) desencadena cambios en el ciclo meiótico, rompimiento de DNA doble cadena (DSB), apoptosis y modificación de la metilación de histonas, únicamente en ovocitos rodeados CCs, pero no en ovocitos sin *cumulus*, lo que demuestra que las CCs juegan un papel importante en la mediación de los efectos de los xenobióticos en la maduración de los ovocitos (Song et al., 2017). Resultados similares fueron descritos por Sun et al. (2017), quienes encontraron que el DSB en el DNA induce la formación de filamentos de actina nuclear (que desempeña un papel en la reparación del DNA) en ovocitos rodeados por CCs pero no en ovocitos desnudos.

El presente estudio confirmó que el PFHxS afecta significativamente la maduración de los ovocitos de cerdo y que, entre los posibles mecanismos de acción, se encuentran la alteración del potencial de la membrana mitocondrial en el ovocito y el daño al DNA en las CCs. Tales efectos fueron inducidos por la exposición a concentraciones equivalentes a 50- y 100 μM

Se ha reportado que, en trabajadores expuestos ocupacionalmente en China, las concentraciones séricas de PFHxS eran tan altas como 39 μM (15700 ng/mL, en trabajadores del departamento de sulfonación, según la tabla 2) (Fu et al., 2016), cuyo valor es cercano a la concentración de 50 μM utilizada en el presente estudio, lo que indica que esta concentración podría ser relevante para humanos y representa un riesgo para la salud reproductiva.

Cabe mencionar que algunos estudios han demostrado que, a diferencia de lo que sucede con otros contaminantes orgánicos persistentes, existe una correlación entre las concentraciones de PFHxS en suero y en fluido folicular (FF), sin encontrar diferencias significativas entre ambas matrices (Heffernan et al., 2018; McCoy et al., 2017; Petro et al., 2014). Este hallazgo resulta importante teniendo en consideración que el microambiente intrafolicular puede influenciar la maduración y la adquisición de la competencia del ovocito (Da Broi et al., 2018).

Da Broi et al., (2018) refieren que el FF puede reflejar la composición del plasma y acumular compuestos dañinos que afecten la maduración del ovocito. Bajo condiciones adversas, las CCs son incapaces de proteger al ovocito contra las alteraciones del FF, lo cual puede alterar las funciones de las CCs y afectar negativamente la calidad del ovocito.

Un folículo en crecimiento (que comprende células foliculares somáticas y el ovocito) está rodeado por una red capilar que es responsable de la vascularización folicular. Junto con las células foliculares, esta vasculatura constituye la barrera hemofolicular, que es importante para la formación del fluido folicular, la transferencia de nutrientes y la protección de los ovocitos (Da Broi et al., 2018; Kang et al., 2020). Sin embargo, se sabe que el PFHxS es capaz de atravesar la barrera hemofolicular (Ding et al., 2020; Kang et al., 2020; Petro et al., 2014), afectando de este modo la funcionalidad de las CCs y consecuentemente, el desarrollo y maduración del ovocito, tal como lo muestra el presente estudio.

La exposición a PFHxS [50 μ M] es especialmente relevante si se considera que en este estudio solo hemos analizado los efectos agudos del PFHxS, mientras que en situaciones de la vida real las poblaciones humanas están sujetas a exposiciones prolongadas de bajo nivel (Akingbemi et al., 2004).

No obstante, se necesitan más experimentos para comprender completamente los mecanismos subyacentes a la inhibición de la MIV por PFHxS, incluida la homeostasis del calcio, la proliferación de peroxisomas y la generación de ERO, que se han informado como mecanismos citotóxicos de PFCs en células somáticas y germinales (Guo et al., 2021; Y. J. Lee et al., 2014b; Ng & Baharom, 2018; Shoeib et al., 2005; Torner et al., 2004).

9. CONCLUSIONES

- El PFHxS tiene un efecto citotóxico en ovocitos porcinos cultivados *in vitro* ($CL_{50} = 329.1 \mu\text{M}$).
- El PFHxS inhibe la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos ($CIM_{50} = 91.68 \mu\text{M}$).
- El PFHxS no afecta la comunicación intercelular a través de uniones *gap* entre el ovocito y las células del *cumulus*.
- El PFHxS disminuye el $m\Delta\Psi$ en ovocitos, durante la MIV.
- El PFHxS induce daño genotóxico en células del *cumulus*

10. PERSPECTIVAS

Dado que los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la inhibición de la maduración de ovocitos, por exposición a PFHxS, no ha sido completamente esclarecida, resultan necesarios nuevos estudios que nos permitan dilucidar los efectos del PFC.

Para tal fin, y, complementando los hallazgos aquí reportados, es importante profundizar en el estudio de la función mitocondrial, mediante la determinación de la distribución de mitocondrias activas y los niveles de ATP, e investigando su correlación con los cambios en el potencial de membrana. Asimismo, resulta necesario evaluar los niveles de cAMP en las CCs y en el ovocito.

Es imprescindible, además, evaluar otros posibles mecanismos por los cuales el PFHxS induce la inhibición de la maduración, incluyendo la proliferación de peroxisomas, la homeostasis de calcio y la generación de ERO.

11. REFERENCIAS

- Abeydeera, L. R., Wang, W., Prather, R. S., & Day, B. N. (1998). Maturation in Vitro of Pig Oocytes in Protein-Free Culture Media: Fertilization and Subsequent Embryo Development in Vitro1. *Biology of Reproduction*, 58(5), 1316–1320. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.5.1316>
- Al-Zubaidi, U., Liu, J., Cinar, O., Robker, R. L., Adhikari, D., & Carroll, J. (2019). The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*, 25(11), 695–705. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz055>
- Ali, J. M., Roberts, S. M., Gordon, D. S., & Stuchal, L. D. (2019). Derivation of a chronic reference dose for perfluorohexane sulfonate (PFHxS) for reproductive toxicity in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 108, 104452. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104452>
- Arbuckle, T. E., Kubwabo, C., Walker, M., Davis, K., Lalonde, K., Kosarac, I., Wen, S. W., & Arnold, D. L. (2013). Umbilical cord blood levels of perfluoroalkyl acids and polybrominated flame retardants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(2), 184–194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.03.004>
- Barcena, P., López-Fernández, C., García-Ochoa, C., Obradors, A., Vernaeva, V., Gosálvez, J., & Vassena, R. (2015). Detection of DNA damage in cumulus cells using a chromatin dispersion assay. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(5), 277–285. <https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1063739>
- Beeson, S., Genuis, S. J., Benskin, J. P., & Martin, J. W. (2012). Exceptionally high serum concentrations of perfluorohexanesulfonate in a Canadian family are linked to home carpet treatment applications. *Environmental Science & Technology*, 46(23), 12960–12967. <https://doi.org/10.1021/es3034654>
- Bijland, S., Rensen, P. C. N., Pieterman, E. J., Maas, A. C. E., van der Hoorn, J. W., van Erk, M. J., Havekes, L. M., Willems van Dijk, K., Chang, S.-C., Ehresman, D. J., Butenhoff, J. L., & Princen, H. M. G. (2011). Perfluoroalkyl sulfonates cause alkyl chain length-dependent hepatic steatosis and hypolipidemia mainly by impairing lipoprotein production

- in APOE*3-Leiden CETP mice. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 123(1), 290–303. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr142>
- Calafat, A. M., Kato, K., Hubbard, K., Jia, T., Botelho, J. C., & Wong, L.-Y. (2019). Legacy and alternative per- and polyfluoroalkyl substances in the U.S. general population: Paired serum-urine data from the 2013–2014 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environment International*, 131, 105048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105048>
- Cassone, C. G., Taylor, J. J., O'Brien, J. M., Williams, A., Yauk, C. L., Crump, D., & Kennedy, S. W. (2012). Transcriptional profiles in the cerebral hemisphere of chicken embryos following in ovo perfluorohexane sulfonate exposure. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 129(2), 380–391. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs219>
- Cassone, C. G., Vongphachan, V., Chiu, S., Williams, K. L., Letcher, R. J., Pelletier, E., Crump, D., & Kennedy, S. W. (2012). In ovo effects of perfluorohexane sulfonate and perfluorohexanoate on pipping success, development, mRNA expression, and thyroid hormone levels in chicken embryos. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 127(1), 216–224. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs072>
- Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S. Y., Horner, K., Jin, C., & Tsafirri, A. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 153–159. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00686-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00686-4)
- D'Hollander, W., De Voogt, P., de coen, W., & Bervoets, L. (2010). Perfluorinated Substances in Human Food and Other Sources of Human Exposure. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 208, 179–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6880-7_4
- Da Broi, M. G., Giorgi, V. S. I., Wang, F., Keefe, D. L., Albertini, D., & Navarro, P. A. (2018). Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(5), 735–751. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>
- Ding, N., Harlow, S. D., Randolph Jr, J. F., Loch-Carus, R., & Park, S. K. (2020).

Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and their effects on the ovary. *Human Reproduction Update*, 26(5), 724–752. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa018>

Domínguez, A., Salazar, Z., Arenas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Casas, E., Teteltila, M., & Bonilla, E. (2016). Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 35, 93–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.05.011>

Domínguez, A., Salazar, Z., Betancourt, M., Ducolomb, Y., Casas, E., Fernández, F., Bahena, I., Salomón, A., Teteltila, M., Martínez, R., Chaparro, A., Cuapio, P., Salazar-López, C., & Bonilla, E. (2019). Effect of perfluorodecanoic acid on pig oocyte viability, intracellular calcium levels and gap junction intercellular communication during oocyte maturation in vitro. *Toxicology in Vitro*, 58, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.041>

Egerszegi, I., Alm, H., Rátky, J., Heleil, B., Brüssow, K.-P., & Torner, H. (2010). Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(5), 830–838. <https://doi.org/10.1071/RD09140>

Einaudi, L., Courbiere, B., Tassistro, V., Prevot, C., Sari-Minodier, I., Orsiere, T., & Perrin, J. (2013). In vivo exposure to benzo(a)pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells. *Human Reproduction*, 29(3), 548–554. <https://doi.org/10.1093/humrep/det439>

Eisner, V., Picard, M., & Hajnóczky, G. (2018). Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nature Cell Biology*, 20(7), 755–765. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0133-0>

Farooq, S., Mazhar, A., Ghouri, A., Haq, I., & Ullah, N. (2020). One-Pot Multicomponent Synthesis and Bioevaluation of Tetrahydroquinoline Derivatives as Potential Antioxidants, α -Amylase Enzyme Inhibitors, Anti-Cancerous and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*, 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25112710>

Fei, C., McLaughlin, J. K., Lipworth, L., & Olsen, J. (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Human Reproduction*, 24(5), 1200–1205.

<https://doi.org/10.1093/humrep/den490>

- Fisher, M., Arbuckle, T. E., Wade, M., & Haines, D. A. (2013). Do perfluoroalkyl substances affect metabolic function and plasma lipids?--Analysis of the 2007-2009, Canadian Health Measures Survey (CHMS) Cycle 1. *Environmental Research*, 121, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.11.006>
- Fromme, H., Tittlemier, S., Völkel, W., Wilhelm, M., & Twardella, D. (2009). Perfluorinated compounds – Exposure assessment for the general population in Western countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212, 239–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2008.04.007>
- Fu, J., Gao, Y., Cui, L., Wang, T., Liang, Y., Qu, G., & Yuan, B. (2016). Occurrence, temporal trends, and half-lives of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in occupational workers in. *Nature Publishing Group, May*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep38039>
- Governini, L., Orvieto, R., Guerranti, C., Gambera, L., De Leo, V., & Piomboni, P. (2011). The impact of environmental exposure to perfluorinated compounds on oocyte fertilization capacity. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(5), 415–418. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9548-2>
- Guo, C., Zhao, Z., Zhao, K., Huang, J., Ding, L., Huang, X., Meng, L., Li, L., Wei, H., & Zhang, S. (2021). Perfluorooctanoic acid inhibits the maturation rate of mouse oocytes cultured in vitro by triggering mitochondrial and DNA damage. *Birth Defects Research*. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1899>
- Guruge, K. S., Taniyasu, S., Yamashita, N., Wijeratna, S., Mohotti, K. M., Seneviratne, H. R., Kannan, K., Yamanaka, N., & Miyazaki, S. (2005). Perfluorinated organic compounds in human blood serum and seminal plasma: a study of urban and rural tea worker populations in Sri Lanka. *Journal of Environmental Monitoring*, 7(4), 371–377. <https://doi.org/10.1039/B412532K>
- Heffernan, A. L., Cunningham, T. K., Drage, D. S., Aylward, L. L., Thompson, K., Vijayasathy, S., Mueller, J. F., Atkin, S. L., & Sathyapalan, T. (2018). Perfluorinated alkyl acids in the serum and follicular fluid of UK women with and without polycystic ovarian syndrome undergoing fertility treatment and associations with hormonal and metabolic parameters.

International Journal of Hygiene and Environmental Health, 221(7), 1068–1075.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.07.009>

Hoffman, K., Webster, T. F., Weisskopf, M. G., Weinberg, J., & Vieira, V. M. (2010). Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and attention deficit/hyperactivity disorder in U.S. children 12-15 years of age. *Environmental Health Perspectives*, 118(12), 1762–1767.
<https://doi.org/10.1289/ehp.1001898>

Hu, W., Jones, P. D., Upham, B. L., Trosko, J. E., Lau, C., & Giesy, J. P. (2002). Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication by Perfluorinated Compounds in Rat Liver and Dolphin Kidney Epithelial Cell Lines in Vitro and Sprague-Dawley Rats in Vivo. *Toxicological Sciences*, 68(2), 429–436. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.2.429>

Huang, Q., Liu, L., Wu, Y., Wang, X., Luo, L., Nan, B., Zhang, J., Tian, M., & Shen, H. (2019). Seminal plasma metabolites mediate the associations of multiple environmental pollutants with semen quality in Chinese men. *Environment International*, 132, 105066.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105066>

Jensen, T. K., Andersen, L. B., Kyhl, H. B., Nielsen, F., Christesen, H. T., & Grandjean, P. (2015). Association between Perfluorinated Compound Exposure and Miscarriage in Danish Pregnant Women. *PLOS ONE*, 10(4), e0123496.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123496>

Jin, C., Sun, Y., Islam, A., Qian, Y., & Ducatman, A. (2011). Perfluoroalkyl Acids Including Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorohexane Sulfonate in Firefighters. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 53(3).
https://journals.lww.com/joem/Fulltext/2011/03000/Perfluoroalkyl_Acids_Including_Perfluorooctane.17.aspx

Joensen, U. N., Bossi, R., Leffers, H., Jensen, A. A., Skakkebaek, N. E., & Jørgensen, N. (2009). Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environmental Health Perspectives*, 117(6), 923–927. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800517>

Kang, Q., Gao, F., Zhang, X., Wang, L., Liu, J., Fu, M., Zhang, S., Wan, Y., Shen, H., & Hu, J. (2020). Nontargeted identification of per- and polyfluoroalkyl substances in human follicular fluid and their blood-follicle transfer. *Environment International*, 139, 105686.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105686>

- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K. S., Loganathan, B. G., Mohd, M. A., Olivero, J., Van Wouwe, N., Yang, J. H., & Aldoust, K. M. (2004). Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environmental Science & Technology*, 38(17), 4489–4495. <https://doi.org/10.1021/es0493446>
- Kim, Y. R., White, N., Bräunig, J., Vijayasathy, S., Mueller, J. F., Knox, C. L., Harden, F. A., Pacella, R., & Toms, L.-M. L. (2020). Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFASs) in follicular fluid from women experiencing infertility in Australia. *Environmental Research*, 190, 109963. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109963>
- Kjeldsen, L. S., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2013). Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(11), 8031–8044. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1753-3>
- Kleszczyński, K., Stepnowski, P., & Składanowski, A. C. (2009). Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids: II. Disruption of mitochondrial bioenergetics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235(2), 182–190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.11.021>
- Kowalczyk, J., Ehlers, S., Oberhausen, A., Tischer, M., Fürst, P., Schafft, H., & Lahrssen-Wiederholt, M. (2013). Absorption, distribution, and milk secretion of the perfluoroalkyl acids PFBS, PFHxS, PFOS, and PFOA by dairy cows fed naturally contaminated feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61. <https://doi.org/10.1021/jf304680j>
- Kubwabo, C., Kosarac, I., & Lalonde, K. (2013). Determination of selected perfluorinated compounds and polyfluoroalkyl phosphate surfactants in human milk. *Chemosphere*, 91(6), 771–777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.011>
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., & Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl Acids: A Review of Monitoring and Toxicological Findings. *Toxicological Sciences*, 99(2), 366–394. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm128>
- Lee, I., & Viberg, H. (2013). A single neonatal exposure to perfluorohexane sulfonate (PFHxS)

- affects the levels of important neuroproteins in the developing mouse brain. *Neurotoxicology*, 37, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.05.007>
- Lee, S.-K., Zhao, M.-H., Kwon, J.-W., Li, Y.-H., Lin, Z.-L., Jin, Y.-X., Kim, N.-H., & Cui, X.-S. (2014). The association of mitochondrial potential and copy number with pig oocyte maturation and developmental potential. *The Journal of Reproduction and Development*, 60(2), 128–135. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-098>
- Lee, Y. J., Choi, S.-Y., & Yang, J.-H. (2014a). PFHxS induces apoptosis of neuronal cells via ERK1/2-mediated pathway. *Chemosphere*, 94, 121–127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.059>
- Lee, Y. J., Choi, S.-Y., & Yang, J. H. (2014b). NMDA receptor-mediated ERK 1/2 pathway is involved in PFHxS-induced apoptosis of PC12 cells. *Science of The Total Environment*, 491–492, 227–234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.114>
- Leoni, G. G., Palmerini, M. G., Satta, V., Succu, S., Pasciu, V., Zinellu, A., Carru, C., Macchiarelli, G., Nottola, S. A., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2015). Differences in the Kinetic of the First Meiotic Division and in Active Mitochondrial Distribution between Prepubertal and Adult Oocytes Mirror Differences in their Developmental Competence in a Sheep Model. *PloS One*, 10(4), e0124911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124911>
- Liu, S., Yang, R., Yin, N., & Faiola, F. (2020). The short-chain perfluorinated compounds PFBS, PFHxS, PFBA and PFHxA, disrupt human mesenchymal stem cell self-renewal and adipogenic differentiation. *Journal of Environmental Sciences*, 88, 187–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.08.016>
- Lorber, M., Eaglesham, G. E., Hobson, P., Toms, L.-M. L., Mueller, J. F., & Thompson, J. S. (2015). The effect of ongoing blood loss on human serum concentrations of perfluorinated acids. *Chemosphere*, 118, 170–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.093>
- Maisonet, M., Calafat, A. M., Marcus, M., Jaakkola, J. J. K., & Lashen, H. (2015). Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Serum Testosterone Concentrations at 15 Years of Age in Female ALSPAC Study Participants. *Environmental Health Perspectives*, 123(12),

1325–1330. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408847>

- Maisonet, M., Terrell, M. L., McGeehin, M. A., Christensen, K. Y., Holmes, A., Calafat, A. M., & Marcus, M. (2012). Maternal concentrations of polyfluoroalkyl compounds during pregnancy and fetal and postnatal growth in British girls. *Environmental Health Perspectives*, *120*(10), 1432–1437. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003096>
- McCoy, J. A., Bangma, J. T., Reiner, J. L., Bowden, J. A., Schnorr, J., Slowey, M., O'Leary, T., Guillette, L. J., & Parrott, B. B. (2017). Associations between perfluorinated alkyl acids in blood and ovarian follicular fluid and ovarian function in women undergoing assisted reproductive treatment. *Science of The Total Environment*, *605–606*, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.137>
- Mehlmann, L. M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, *130*(6), 791–799. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00793>
- Mondal, D., Weldon, R. H., Armstrong, B. G., Gibson, L. J., Lopez-Espinosa, M.-J., Shin, H.-M., & Fletcher, T. (2014). Breastfeeding: a potential excretion route for mothers and implications for infant exposure to perfluoroalkyl acids. *Environmental Health Perspectives*, *122*(2), 187–192. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306613>
- Ng, H., & Baharom, S. (2018). An Analysis on Adult Learners' Satisfaction in Online Education Programmes. *International Journal of Interactive Mobile Technologies (IJIM)*, *12*, 70. <https://doi.org/10.3991/ijim.v12i7.9665>
- Olsen, G. W., Burris, J. M., Ehresman, D. J., Froehlich, J. W., Seacat, A. M., Butenhoff, J. L., & Zobel, L. R. (2007). Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environmental Health Perspectives*, *115*(9), 1298–1305. <https://doi.org/10.1289/ehp.10009>
- Oseguera-López, I., Pérez-Cerezales, S., Ortiz-Sánchez, P. B., Mondragon-Payne, O., Sánchez-Sánchez, R., Jiménez-Morales, I., Fierro, R., & González-Márquez, H. (2020). Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) Alters Protein Phosphorylation, Increase ROS Levels and DNA Fragmentation during In Vitro

- Capacitation of Boar Spermatozoa. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 10(10), 1934. <https://doi.org/10.3390/ani10101934>
- Petro, E. M. L., D'Hollander, W., Covaci, A., Bervoets, L., Fransen, E., De Neubourg, D., De Pauw, I., Leroy, J. L. M. R., Jorssen, E. P. A., & Bols, P. E. J. (2014). Perfluoroalkyl acid contamination of follicular fluid and its consequence for in vitro oocyte developmental competence. *The Science of the Total Environment*, 496, 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.028>
- Post, G. B., Cohn, P. D., & Cooper, K. R. (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: A critical review of recent literature. *Environmental Research*, 116, 93–117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.03.007>
- Raman, R. S., Chan, P. J., Corselli, J. U., Patton, W. C., Jacobson, J. D., Chan, S. R., & King, A. (2001). Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection*. *Human Reproduction*, 16(5), 831–835. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.831>
- Renner, R. (2001). Growing concern over perfluorinated chemicals. *Environmental Science & Technology*, 35(7), 154A-160A. <https://doi.org/10.1021/es012317k>
- Richard, S., & Baltz, J. M. (2014). Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocyte complex. *Biology of Reproduction*, 90(6), 137. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118505>
- Russo, R., Monaco, D., Rubessa, M., El-Bahrawy, K. A., El-Sayed, A., Martino, N. A., Beneut, B., Ciannarella, F., Dell'Aquila, M. E., Lacalandra, G. M., & Filioli Uranio, M. (2014). Confocal fluorescence assessment of bioenergy/redox status of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) oocytes before and after in vitromaturation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-16>
- Sasseville, M., Gagnon, M.-C., Guillemette, C., Sullivan, R., Gilchrist, R. B., & Richard, F. J. (2009). Regulation of Gap Junctions in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes: Contributions of Granulosa Cell Contact, Gonadotropins, and Lipid Rafts. *Molecular Endocrinology*, 23(5), 700–710. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0320>

- Sela-Abramovich, S., Edry, I., Galiani, D., Nevo, N., & Dekel, N. (2006). Disruption of Gap Junctional Communication within the Ovarian Follicle Induces Oocyte Maturation. *Endocrinology*, *147*(5), 2280–2286. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1011>
- Shoeib, M., Harner, T., Wilford, B., Jones, K., & Zhu, J. (2005). Perfluorinated Sulfonamides in Indoor and Outdoor Air and Indoor Dust: Occurrence, Partitioning, and Human Exposure. *Environmental Science & Technology*, *39*, 6599–6606. <https://doi.org/10.1021/es048340y>
- Sivandzade, F., Bhalerao, A., & Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-Protocol*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3128>
- Song, Z.-Q., Li, X., Wang, Y.-K., Du, Z.-Q., & Yang, C.-X. (2017). DMBA acts on cumulus cells to desynchronize nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Scientific Reports*, *7*(1), 1687. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01870-6>
- Sun, M. H., Yang, M., Xie, F. Y., Wang, W., Zhang, L., Shen, W., Yin, S., & Ma, J. Y. (2017). DNA double-strand breaks induce the nuclear actin filaments formation in cumulus-enclosed oocytes but not in denuded oocytes. *PLoS ONE*, *12*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170308>
- Sun, M. H., Zheng, J., Xie, F. Y., Shen, W., Yin, S., & Ma, J. Y. (2015). Cumulus cells block oocyte meiotic resumption via gap junctions in cumulus oocyte complexes subjected to DNA double-strand breaks. *PLoS ONE*, *10*(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143223>
- Sundström, M., Ehresman, D. J., Bignert, A., Butenhoff, J. L., Olsen, G. W., Chang, S.-C., & Bergman, Å. (2011). A temporal trend study (1972–2008) of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in pooled human milk samples from Stockholm, Sweden. *Environment International*, *37*(1), 178–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.08.014>
- Suski, J. M., Lebiezinska, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszynski, J., & Wieckowski, M. R. (2012). Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *810*, 183–205. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_12

- Suzuki, H., Jeong, B., & Yang, X. (2000). *Dynamic Changes of Cumulus-Oocyte Cell Communication During In Vitro Maturation of Porcine Oocytes 1*. 729(February), 723–729.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., & de Kruif, A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61(3), 414–424. <https://doi.org/10.1002/mrd.10102>
- Thomas, R. E., Armstrong, D. T., & Gilchrist, R. B. (2004). Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels1. *Biology of Reproduction*, 70(3), 548–556. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021204>
- Toft, G., Jönsson, B. A. G., Lindh, C. H., Giwercman, A., Spano, M., Heederik, D., Lenters, V., Vermeulen, R., Rylander, L., Pedersen, H. S., Ludwicki, J. K., Zvezdai, V., & Bonde, J. P. (2012). Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in Arctic and European populations. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(8), 2532–2540. <https://doi.org/10.1093/humrep/des185>
- Torner, H., Brüssow, K.-P., Alm, H., Ratky, J., Pöhland, R., Tuchscherer, A., & Kanitz, W. (2004). Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology*, 61(9), 1675–1689. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.013>
- Vélez, M. P., Arbuckle, T. E., & Fraser, W. D. (2015). Maternal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fecundity: The MIREC study. *Human Reproduction*, 30(3), 701–709. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu350>
- Wang, L., Wang, D., Zou, X., & Xu, C. (2009). Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(7), 483–492. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820379>
- Wen, L.-L., Lin, L.-Y., Su, T.-C., Chen, P.-C., & Lin, C.-Y. (2013). Association between serum perfluorinated chemicals and thyroid function in U.S. adults: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2010. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(9), E1456-64. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1282>

- Wielsøe, M., Long, M., Ghisari, M., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2015). Perfluoroalkylated substances (PFAS) affect oxidative stress biomarkers in vitro. *Chemosphere*, *129*, 239–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.014>
- Worley, R. R., Moore, S. M., Tierney, B. C., Ye, X., Calafat, A. M., Campbell, S., Woudneh, M. B., & Fisher, J. (2017). Per- and polyfluoroalkyl substances in human serum and urine samples from a residentially exposed community. *Environment International*, *106*, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.007>
- Yan, W., J., R. W., Pau-Chung, C., Guang-Wen, L., Hsiao-Yen, C., Ying-Chih, T., P., L. M., & Shu-Li, W. (2014). Association between Maternal Serum Perfluoroalkyl Substances during Pregnancy and Maternal and Cord Thyroid Hormones: Taiwan Maternal and Infant Cohort Study. *Environmental Health Perspectives*, *122*(5), 529–534. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306925>
- Zhang, D., Keilty, D., Zhang, Z. F., & Chian, R. C. (2017). Mitochondria in oocyte aging: current understanding. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, *9*(1), 29–38. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28721182>
- Zhang, S., Tan, R., Pan, R., Xiong, J., Tian, Y., Wu, J., & Chen, L. (2018). Association of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances With Premature Ovarian Insufficiency in Chinese Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *103*(7), 2543–2551. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02783>
- Zhao, W., Cui, R., Wang, J., & Dai, J. (2017). Inhibition effects of perfluoroalkyl acids on progesterone production in mLTC-1. *Journal of Environmental Sciences*, *56*, 272–280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.026>
- Zhou, C.-J., Wu, S.-N., Shen, J.-P., Wang, D.-H., Kong, X.-W., Lu, A., Li, Y.-J., Zhou, H.-X., Zhao, Y.-F., & Liang, C.-G. (2016). The beneficial effects of cumulus cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice. *PeerJ*, *4*, e1761–e1761. <https://doi.org/10.7717/peerj.1761>
- Zhou, W., Zhang, L., Tong, C., Fang, F., Zhao, S., Tian, Y., Tao, Y., Zhang, J., & Study, S. B. C. (2017). Plasma Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances Concentration and Menstrual Cycle Characteristics in Preconception Women. *Environmental Health*

Perspectives, 125(6), 67012. <https://doi.org/10.1289/EHP1203>

Zhou, Y., Hu, L.-W., Qian, Z. M., Chang, J.-J., King, C., Paul, G., Lin, S., Chen, P.-C., Lee, Y. L., & Dong, G.-H. (2016). Association of perfluoroalkyl substances exposure with reproductive hormone levels in adolescents: By sex status. *Environment International*, 94, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.018>



Efecto del sulfonato de perfluorohexano en la viabilidad, la comunicación intercelular ovocito células del cumulus, la función mitocondrial y el daño al DNA en células del cumulus durante la maduración in vitro de ovocitos porcinos.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 17:00 horas del día 17 del mes de mayo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
- DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES
- DR. PABLO ENRIQUE DOMINGUEZ LOPEZ
- DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO
- DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO




REBECA MARTINEZ QUEZADA
ALUMNA

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: REBECA MARTINEZ QUEZADA

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

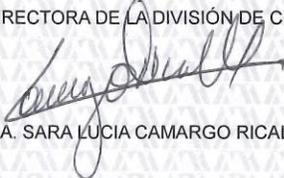
REVISÓ



MTRA. ROSALVA FERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL



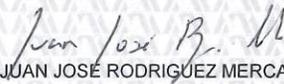
DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

VOCAL



DR. PABLO ENRIQUE DOMINGUEZ LOPEZ

VOCAL



DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO

SECRETARIO



DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO