



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

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

T E S I S

**“EFECTO DEL METILPARABENO EN LA INTEGRIDAD DEL ADN DE LAS
CÉLULAS DEL CÚMULO DE OVOCITOS PORCINOS”**

Para obtener el grado de
Maestra en biología de la reproducción animal

PRESENTA:

MVZ. YENNY PAOLA RAMÍREZ JARA
Matrícula:2213800798
yennyram0110@gmail.com

CO-DIRECTORES

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos
Dra. Alma Guadalupe López López

JURADO

Presidente: Dr. José Miguel Betancourt Rule
Secretario: Dr. Eduardo Casas Hernández
Vocal: Dra. Edith Arenas Ríos
Vocal: Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Iztapalapa, Ciudad de México a 14 de marzo, 2024

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

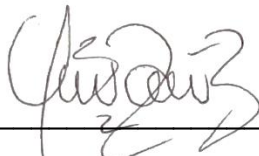
Ciudad de México, a 8 de marzo de 2024

Comisión Académica del Posgrado

Presente

La que suscribe Yenny Paola Ramirez Jara alumno(a) con número de matrícula 2213800798, del posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Efecto del metilparabeno en la integridad del ADN de las células del cúmulo de ovocitos porcinos” a desarrollar en el laboratorio de Biología Celular R-009 de la UAM Iztapalapa. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Yenny Paola Ramírez Jara

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe Yenny Paola Ramírez Jara alumna de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Itztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada “Efecto del metilparabeno en la integridad del ADN de las células del cúmulo de ovocitos porcinos”.

Declaro que:

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 08 de marzo de 2024.

Atentamente



Yenny Paola Ramírez Jara

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORAS:

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Profesora Titular "A" Tiempo Completo
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo: fahiel@xanum.uam.mx

Dra. Alma Guadalupe López López

Profesora Asociada "D" Tiempo Completo
Laboratorio de Biología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo: alma.lopez@xanum.uam.mx

ASESOR:

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor Titular "C" Tiempo Completo
Laboratorio de Biología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo: dino@xanum.uam.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Los miembros del jurado del examen designado por la División de Ciencias Biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Efecto del metilparabeno en la integridad del ADN de las células del cúmulo de ovocitos porcinos" el día 14 de marzo del 2024.



PRESIDENTE

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM-Iztapalapa



SECRETARIO

Dr. Eduardo Casas Hernández

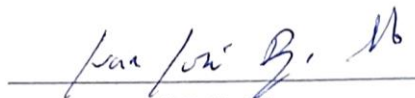
Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM-Iztapalapa



VOCAL

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la
Salud
UAM-Iztapalapa



VOCAL

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Unidad de investigación en Genética y Toxicología Ambiental
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Este trabajo se realizó en el **Laboratorio de Biología Celular** R-009 de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Este estudio contó con el apoyo de **CONAHCyT** para estudios de posgrado. Otorgado a Yenny Paola Ramírez Jara con **CVU**: 1187723.

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

DEDICATORIA

A Dios por permitirme estar aquí, por darme vida, salud, fortaleza y voluntad para salir de mi zona de confort y cumplir mis sueños. Todos mis logros son por ti.

A mi mamá por ser el regalo más grande que me dio la vida, por ser mi guía, mi apoyo, mi ejemplo y motivación, a ti debo todo lo que soy y espero que me alcance la vida para retribuirte tanto amor, dedicación y hacerte sentir muy orgullosa. Sé que Dios y la vida nos van a recompensar este tiempo que no hemos estado juntas porque aún en la distancia, día a día siento tu amor y es lo que hace que todos los días me despierte con toda la motivación para crecer, aprender y ser cada día mejor.

A mi papá por forjar mi carácter, por hacerme independiente, por inculcarme grandes valores y bases sólidas para obrar siempre de manera correcta, honesta, responsable. Dando el 100% y haciendo las cosas “bien hechas”, por ser mi ejemplo, mi modelo a seguir y a quien le debo hoy estar aquí, gracias por nunca cortar mis alas y permitirme volar hacia mis sueños.

A mis hermanos, que día a día me hacen sentir honrada y orgullosa de tenerlos, por ser mis cómplices, mis amigos, mis compañeros de vida y quienes me impulsan a mostrar lo mejor de mí.

A toda mi familia que me ha apoyado en la distancia, solo Dios sabe lo difícil que ha sido tenerlos lejos, pero gracias a ese amor incondicional que encuentro en ustedes hoy estoy aquí culminando esta gran etapa.

A mis grandes amigas. Sindy gracias por ser la hermana que me regaló la vida, hemos crecido, madurado y aprendido mil cosas juntas, por eso este logro va dedicado a ti, gracias por estar orgullosa de los logros que alcanzamos. A Caro por darme el mejor regalo (Evaluna), por apoyarme, por aconsejarme, por ser un ejemplo de vida, de amor, no sabe lo orgullosa que estoy de todo lo que ha logrado. Y finalmente Flaca gracias y mil gracias, esto no hubiera sido posible sin su motivación para estar aquí, gracias por creer en mí, por ser mi compañía, por no dejarme caer. Usted sabe cuánto nos ha costado y por eso este logro es de las dos.

A mis ángeles que desde el cielo me cuidan, me guían y me llenan de fortaleza. Tía Ve, sé que en el cielo estas celebrando este logro por las dos.

A mis bebés Teo y Dona, por ser mi compañía siempre y recibirme con todo el amor del mundo. Ojalá en el cielo sigas siendo un perrito feliz.

A todos, gracias por creer.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos**, gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por adentrarme en este mundo de la investigación, por ser el mejor referente para continuar en este proceso, no se imagina cuanta admiración y respeto tengo hacia esa labor tan bonita que realiza día a día porque además de enseñar, nos motiva a ser cada día mejores, y sin duda esa oportunidad que usted me brindó al aceptar ser mi directora, me dio la confianza para demostrarme que con dedicación, esfuerzo y amor por lo que hago, cada día puedo ser mejor.

A la **Dra. Alma López López**, gracias por ser la guía en tantos procesos nuevos para mí, por las técnicas, los “tips” y secretos para que todo salga bien, por los llamados de atención que hacen que el trabajo sea perfecto. Por todo eso y por ser cómplice, amiga y un gran apoyo en muchos momentos difíciles.

Al **Dr. Eduardo Casas Hernández**, gracias por todos sus consejos, sus conferencias, y enseñanzas. Por invitarnos a ser parte de la investigación y como a través de la divulgación científica, hacemos un gran aporte a la sociedad. Esa dedicación y energía tan especial que pone a cada actividad en pro de la ciencia sin duda hace que todos nos contagiemos por transmitir el conocimiento.

Al **Dr. José Miguel Betancourt Rule**, gracias por su sabiduría, por hacer del laboratorio un segundo hogar para todos, por sus enseñanzas su paciencia y ese don infinito de enseñar. Sin duda es un ejemplo a seguir para todos quienes hemos tenido el honor de trabajar con usted.

A la **Dra. Zayil Salazar** por transmitirnos su conocimiento con la mejor actitud, con ese gran carisma y comprensión que hace parecer todo más simple. Gracias por ser un apoyo y una gran fuente de conocimiento.

Al **Dr. Juan José Rodríguez Mercado** y la **Dra. Edith Arenas**, por aceptar hacer parte de este proyecto y aportar a él con sus comentarios y sugerencias como sinodales.

A todos los doctores que contribuyeron a mi formación durante las clases, gracias por transmitirme el conocimiento de manera didáctica y a pesar de las clases virtuales, hacer de este proceso algo enriquecedor durante toda la maestría.

A mis compañeros de la maestría que hicieron que este proceso aportara en muchos aspectos de mi vida, no solo en lo académico. Gracias por brindarme su apoyo, por ser guías y cómplices en muchos planes y actividades que desconocía, gracias por enseñarme la cultura mexicana y hacer que los días difíciles lejos de casa, lo fueran un poco menos. Gracias Karly, Yoab, Sarah, Yessi, Habit, Lupita y Luis, todo mi

cariño para ustedes siempre. A Robert, mil gracias por esa amistad incondicional, por el apoyo, los consejos, las asesorías y toda la ayuda que me has brindado. Gracias por abrirme las puertas de tu hogar y ser un apoyo importante en este proceso.

A mis compañeros de laboratorio, que desde el día uno, me demostraron que es posible tener un equipo de trabajo donde reine la empatía, la unión, el trabajo en equipo, el respeto, la comprensión y el apoyo. No saben lo agradecida que estoy de haber llegado a un lugar tan especial, a todos mil gracias, Sinaí, Bren, Mau, Fer, Jaime, Pao, Karla, Lizeth, Adyeni.

A Eli por ser la mejor maestra, compañera y amiga. Desde el primer momento supe que tenía la mejor compañera de equipo, gracias por transmitirme todo tu conocimiento, por compartir lo que durante años has ido perfeccionando y hoy te lleva a lograr una de tus metas y de paso, ayudarme a mi a cumplir las mías. Te agradezco infinitamente por ser un ser humano maravilloso y que la vida nos diera la fortuna de coincidir.

A **Trinidad Sierra Guzmán**, gracias por brindarnos su apoyo y compañía en la colecta de ovarios, por hacer de la ida al rastro algo más ameno y llevadero.

Al rastro “Los Arcos”, por brindarme las muestras biológicas para la realización de este proyecto.

A **CONAHCyT** por el apoyo proporcionado para realizar el presente trabajo y dedicarme a tiempo completo a realizar investigación y retribuirlo con la presentación de esta tesis.

A la **UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA** unidad Iztapalapa, por abrirme las puertas y permitirme cumplir un objetivo importante en mi vida. Gracias por la oportunidad de pertenecer a esta gran comunidad universitaria.

*“La tarea que tienes por delante nunca será mayor
que el poder que te respalda”.*

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Maduración citoplasmática y nuclear de los ovocitos.....	1
1.2 Importancia de las células del cúmulo.....	2
1.3 Daño al ADN.....	6
1.4 Parabenos.....	8
1.4.1 Parabenos y su efecto a nivel reproductivo.....	10
2. Antecedentes	11
3. Justificación	13
4. Pregunta de investigación	14
5. Hipótesis	14
6. Objetivo general	14
6.1 Objetivos específicos.....	14
7. Diseño experimental	14
8. Metodología	15
8.1 Tratamiento con MePB.....	16
8.2 Maduración <i>in vitro</i>	16
8.3 Evaluación de la viabilidad y MIV.....	17
8.4 Evaluación de la integridad del ADN (Ensayo cometa).....	17
8.5 Análisis estadístico.....	19
9. Resultados	20
9.1 Viabilidad de ovocitos porcinos y células del cúmulo.....	20
9.2 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos porcinos.....	22
9.3 Daño a la cromatina de ovocitos porcinos.....	24
9.4 Integridad del ADN de las células del cúmulo.....	25
10. Discusión	28

10.1 Alteraciones en la viabilidad, MIV y cromatina de ovocitos porcinos.....	29
10.2 Viabilidad de las CC de los ovocitos porcinos.....	32
10.3 Daño a la integridad del ADN de las CC.....	33
11. Conclusiones.....	36
12. Perspectivas.....	37
12. Bibliografía.....	38

ABREVIATURAS

AH	Ácido hialurónico
BuPB	Butil-parabeno
CC	Células del cúmulo
CG	Células de la granulosa
CGM	Células de la granulosa murales
COCs	Complejo ovocito-células del cúmulo
DE	Disruptores endocrinos
DS	Desviación estándar
ER	Receptor de estrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FSH	Hormona folículo estimulante
LF	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
MePB	Metil-parabeno
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MIV	Maduración <i>in vitro</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PB	Parabenos
PHBA	Ácido parahidroxibenzoico
PrPB	Propil-parabeno
PVA	Polivinil alcohol
VG	Vesícula germinal
ZP	Zona pelúcida

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción de las CGM y CC en el arresto meiótico del ovocito (Pan & Li, 2019)	5
Figura 2. Imagen representativa de la extensión de la cauda del cometa (C) en presencia de daño en el ADN.....	7
Figura 3. Estructura química de los PB. Tomado de Boberg et al., 2010.....	8
Figura 4. Diseño experimental.....	15
Figura 5. Selección de COCS.....	20
Figura 6. Evaluación de viabilidad con MTT. Flecha azul: Ovocitos incoloros no viables. Flecha negra: Ovocitos morados viables.....	20
Figura 7. Tinción de MTT para viabilidad de COCs. A. Ovocito vivo - CC vivas (OV-CV) B. Ovocito vivo – CC muertas (OV-CM) C. Ovocito muerto – CC muertas (OM-CM).....	20
Figura 8. Viabilidad de ovocitos de cerdo madurados in vitro expuestos a diferentes concentraciones de MePB. Los datos se presentan como media \pm EE. *Presenta diferencias significativas vs. control, considerando $p < 0.05$	21
Figura 9. Viabilidad de las CC. La cual se encuentra graficada (A,B,C) y representada en imágenes (D, E, F) en la clasificación designada para su evaluación (OV-CV, OV-CM, OM-CM). Los datos se presentan como media \pm EE. *Diferencias significativas vs control, considerando $p < 0.05$	22
Figura 10. Evaluación del estado de maduración nuclear. a. Ovocito en vesícula germinal (inmaduro). b. Ovocito en metafase I (en vía de maduración). c. Ovocito en metafase II (maduro).....	22
Figura 11. Ovocitos de cerdo madurados in vitro expuestos a diferentes concentraciones de MePB en estadio de vesícula germinal. No se encontraron diferencias significativas	23
Figura 12. Ovocitos de cerdo madurados in vitro expuestos a diferentes concentraciones de MePB en estadio de MI. No se encontraron diferencias significativas	23

Figura 13. Ovocitos de cerdo madurados <i>in vitro</i> expuestos a diferentes concentraciones de MePB en estadio de MII. Los datos se presentan como media \pm EE. *Se encontraron diferencias significativas vs control, considerando la $p < 0.0393$	23
Figura 14. Ovocitos de cerdo madurados <i>in vitro</i> expuestos a diferentes concentraciones de MePB donde se observa el daño a cromatina en ovocitos (A,C), alteraciones citoplasmáticas y disminución en la expansión de las CC (B,D).....	24
Figura 15. Ovocitos de cerdo madurados <i>in vitro</i> expuestos a diferentes concentraciones de MePB donde se evidencia daño en la cromatina. Los datos se presentan como media \pm DE. *Se encontraron diferencias significativas vs control, considerado la $p > 0.05$	25
Figura 16. Daño al ADN generado en las células del cúmulo de ovocitos porcinos expuestas a diferentes concentraciones de MePB.....	27
Figura 17. Diagrama esquemático que ilustra los mecanismos de acción ya reportados en otros estudios y en el presente trabajo (indicados en verde) sobre los efectos del MePB en ovocitos y CC.....	35

RESUMEN

Los parabenos (PB) son una serie homóloga de grupos derivados del ácido parahidroxibenzoico (PHBA), esterificados en la posición C-4 (incluidos metil-, etil-, propil-, butil-, etil- y bencilparabeno) que se utilizan ampliamente como conservantes en productos de cuidado personal y conservantes de alimentos dado su efecto antibacteriano y antifúngico. Frecuentemente son usados solos o en combinación, siendo el metilparabeno (MePB) uno de los PB más utilizados por su alta solubilidad. El uso generalizado de PB da como resultado exposiciones a través de una variedad de vías, como la absorción dérmica, la ingestión e inhalación. Esta alta exposición a los PB ha orientado diversos estudios *in vivo* e *in vitro* para determinar su efecto tóxico en diversos sistemas del organismo, encontrando que los PB son causantes de múltiples alteraciones a nivel endocrino y reproductivo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la exposición de ovocitos porcinos a concentraciones de 500 μ M, 750 μ M y 1000 μ M de MePB por medio de la viabilidad y maduración *in vitro* (MIV) y la viabilidad e integridad del ADN de las células del cúmulo (CC). En los resultados se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la viabilidad y maduración de los ovocitos en el grupo expuesto a la concentración de 1000 μ M de MePB con respecto al grupo control. En los ovocitos fue posible evidenciar daño en la cromatina donde se encontraron diferencias significativas en el grupo expuesto a 1000 μ M de MePB. En las CC se evaluó la integridad del ADN, se encontraron diferencias en todos los grupos (500, 750 y 1000 μ M) con respecto al grupo control y la viabilidad donde en el porcentaje ovocitos muertos – granulosa muerta (OM-CM) también se encontraron diferencias significativas en el grupo de 1000 μ M de MePB con respecto al grupo control, lo que permitió dilucidar el efecto que está causando el MePB en las CC. Este efecto es un hallazgo importante ya que no se han reportado estudios que evalúen el efecto del MePB en la integridad del ADN y viabilidad de las CC.

Palabras clave: Metilparabeno, Maduración *in vitro*, células del cúmulo, ovocitos, modelo porcino.

ABSTRACT

Parabens (PB) are a homologous series of groups derived from parahydroxybenzoic acid (PHBA), esterified at the C-4 position (including methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, ethyl- and benzylparaben) that are widely used as preservatives in personal care and food products due to their antibacterial and antifungal effect. They are frequently used alone or in combination, with methylparaben (MePB) being one of the most widely used PBs due to its high solubility. The widespread use of PBs results in exposures through a variety of routes, such as dermal absorption, ingestion and inhalation. This high exposure to PBs has guided several *in vivo* and *in vitro* studies to determine their toxic effect on various body systems, finding that PBs cause multiple alterations at the endocrine and reproductive levels. Therefore, the objective of this study was to evaluate the exposure of porcine oocytes to 500 μM , 750 μM and 1000 μM MePB concentrations by means of *in vitro* viability and maturation (IVM) and cumulus cell (CC) DNA viability and integrity. The results showed significant differences ($p < 0.05$) in the viability and maturation of oocytes in the group exposed to 1000 μM MePB concentration with respect to the control group. In the oocytes it was possible to evidence chromatin damage where significant differences were found in the group exposed to 1000 μM MePB. In the oocytes it was possible to evidence chromatin damage where significant differences were found in the group exposed to 1000 μM MePB. In the CC, DNA integrity was evaluated, differences were found in all groups (500, 750 and 1000 μM) with respect to the control group and viability where in the percentage of dead oocytes - dead granules (OM-CM) significant differences were also found in the 1000 μM MePB group with respect to the control group, which allowed elucidating the effect that MePB is causing in the CC. This effect is an important finding since no studies evaluating the effect of MePB on DNA integrity and viability of DCs have been reported.

Key words: Methylparaben, *in vitro* maturation, cumulus cells, oocytes, porcine experimental model.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Maduración citoplasmática y nuclear de los ovocitos

La liberación de un óvulo maduro y sano para la fertilización es el centro de todo el proceso reproductivo. Desde el momento del desarrollo embrionario hasta la fertilización, el ovocito pasa por varios períodos intermitentes. En la mayoría de los animales, los ovocitos se mantienen en arresto meiótico en la profase I antes de la ovulación. El aumento ovulatorio de la hormona luteinizante (LH) promueve la reanudación de la meiosis de los ovocitos detenidos y su progresión a través del segundo ciclo meiótico, solo para detenerse nuevamente en la metafase II hasta la fertilización (Sen y Caiazza, 2013). La capacidad de un ovocito para experimentar su maduración citoplasmática y nuclear, fertilización y un desarrollo embrionario exitoso se conoce como calidad o competencia de desarrollo del ovocito. La calidad depende de la distribución de los organelos, metabolitos y ARN maternos durante el crecimiento y maduración del ovocito; los cuales van a brindar la capacidad para reanudar la meiosis, completar la maduración, someterse a una fertilización exitosa y apoyar el desarrollo normal del embrión, esta capacidad se adquiere gradualmente a medida que el ovocito crece (Reader et al., 2017).

Durante la maduración de los ovocitos se produce la reorganización extensa de los organelos intracelulares, en particular, la reorganización de las mitocondrias para proporcionar el suministro de energía local, la migración de los gránulos corticales para prepararse para bloquear la polispermia y el movimiento del retículo endoplásmico que anticipa la liberación fásica de Ca^{2+} (Brunet y Maro, 2005; Jones, 2004; Gosden y Lee, 2010). La maduración es esencial para el desarrollo normal y la ploidía ya que, la fertilización prematura en la metafase I (MI) puede causar triploidía. Sin embargo, la mayoría de los ovocitos inmaduros no pueden provocar la liberación repetida de Ca^{2+} necesarias para la activación exitosa por parte de los espermatozoides con capacidad fertilizante. Esta capacidad no se adquiere por completo hasta la metafase II (MII) y disminuye durante el envejecimiento post

ovulatorio, cuando la señal del Ca^{2+} intracelular se convierte de señal activadora a señal de muerte por apoptosis (Gosden y Lee, 2010).

Los ovocitos completamente desarrollados se mantienen detenidos en la Profase I de la meiosis, rodeados de células del cúmulo (CC), líquido folicular (LF), células de la granulosa (CG) y la capa de las células de la teca dentro de un folículo ovárico preovulatorio. Las extensiones citoplasmáticas de las CC atraviesan la zona pelúcida del ovocito y terminan en uniones comunicantes que conectan directamente la CC y el citoplasma del ovocito, lo que permite una comunicación bidireccional continua entre las células somáticas maternas y la célula germinal (Andreas et al., 2021).

En ovocitos, la maduración nuclear implica la ruptura de las vesículas germinales (VG), la condensación y segregación de los cromosomas, la finalización de la meiosis I, la expulsión del primer cuerpo polar y la detención en la metafase de la segunda división meiótica (Abbara et al., 2018). Esta maduración nuclear precisa de proteínas centrosomales, proteínas reguladoras, γ -tubulina y el aparato mitótico nuclear para la formación y mantenimiento adecuado del huso meiótico. Por lo tanto la disociación de estas proteínas centrosomales y la desintegración del huso meiótico que se da durante el envejecimiento de los ovocitos es una de la principales causas de aneuploidía y disminución del potencial de desarrollo (Reader et al., 2017).

El ovocito se vuelve completamente competente cuando pasa de la MI a la MII, es capaz de ser fecundado y generar un embrión viable. Específicamente, la señalización paracrina de las CC al ovocito apoya la reanudación meiótica, permite la maduración nuclear y citoplasmática y controla la actividad transcripcional (Albertini et al., 2001; Martínez et al., 2023).

1.2 Importancia de las células del cúmulo

Las CC se originan a partir de las CG relativamente indiferenciadas. Las CG son el tipo de célula principal del ovario que proporciona el soporte físico y el microambiente necesarios para el ovocito en desarrollo. Se diferencian activamente

en varias poblaciones distintas durante la foliculogénesis, desde una etapa de desarrollo primordial (tipo escamoso) hasta una etapa de desarrollo lútea (células luteínicas hipertrofiadas), pasando por la ovulación (tipo cuboide) (Huang y Wells, 2010).

En el ovario de los mamíferos, los ovocitos se desarrollan dentro del folículo, una estructura compuesta por células somáticas y LF. En el folículo antral, las CC rodean y se conectan al ovocito a través de proyecciones transzonales formando una estructura llamada complejo ovocito-células del cúmulo (COCs) (Martinez et al., 2023).

Las CC desempeñan un papel fundamental en la maduración adecuada de los ovocitos, en la adquisición de una mayor competencia de desarrollo (Fontana et al., 2023) y además los protegen de las especies reactivas de oxígeno (ERO) que se producen principalmente por procesos fisiológicos normales del metabolismo celular, debido a la baja capacidad del ovocito para movilizar por sí solo suficientes moléculas antioxidantes (Martinez et al., 2023).

Las CG están interconectadas por una extensa red de uniones comunicantes, que son importantes para el intercambio metabólico y el transporte de moléculas pequeñas entre células vecinas. Las uniones comunicantes se componen de matrices hexaméricas de proteínas llamadas conexas. La conexina-37 y la conexina-43 (conexina más prominente en los porcinos) son dos de las conexas foliculares más importantes y forman uniones comunicantes con diferentes propiedades de permeabilidad. Además, las CC extienden procesos citoplasmáticos a través de la zona pelúcida (ZP) para formar uniones comunicantes con la membrana plasmática del ovocito (Strauss y Williams, 2019).

Específicamente, la señalización paracrina de las CC al ovocito apoya la reanudación meiótica, permite la maduración nuclear y citoplasmática y controla la actividad transcripcional (Martinez et al., 2023). Las uniones comunicantes de los COCs permiten el intercambio de moléculas pequeñas, incluidos iones, metabolitos, aminoácidos, cAMP y cGMP; estos nucleótidos son los que regulan fundamentalmente el proceso de maduración de los ovocitos, dirigiendo su

progresión a través de la meiosis. Además, el ovocito secreta el factor 9 de diferenciación de crecimiento (GDF9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15), que son factores paracrinos que regulan la función biológica de las CC y coordinan muchos de los eventos de señalización locales asociados en torno a la ovulación (Fontana et al., 2023).

Estos factores de crecimiento, comúnmente llamados factores secretados por ovocitos, además de dictar la diferenciación de las CG, intervienen en la regulación de la proliferación de las CG, CC o ambas y, por tanto, la tasa de crecimiento del folículo; promueven la glucólisis en las CC requerida para el metabolismo de los ovocitos, e intervienen en adquisición de la capacidad de señalización de la familia de factores de crecimiento por parte de las CC, requerida para que el COCs reconozca la cascada ovulatoria y finalmente actúan en el control de la mucificación y expansión de las CC necesarias para la ovulación (Russell et al., 2016). Por lo tanto, las CC apoyan el desarrollo y la maduración del ovocito durante la fase antral y, a su vez, el ovocito responde y regula su entorno en conjunto con las CC para garantizar que las condiciones sean propicias para su crecimiento (Huang y Wells, 2010).

Un paso crítico durante la maduración de los ovocitos es la expansión de las CC, en la que se producen grandes cantidades de ácido hialurónico (AH) mediante la enzima hialuronano sintasa (Luo et al., 2022); esta expansión se inicia con el aumento preovulatorio de LH y es necesaria para la ovulación y fertilización (Strauss y Williams, 2019).

El arresto y reanudación meiótica que sufre el ovocito son otros de los procesos que involucra la comunicación entre las CC y los ovocitos, el cual está mediado principalmente por las concentraciones intracitoplasmáticas de cAMP y cGMP. El cGMP derivado de las CG viaja a través de uniones comunicantes hasta el ovocito y es responsable de mantener la detención meiótica en el diploteno de la profase I antes del aumento preovulatorio de LH. En respuesta a este aumento de LH, la concentración de cGMP disminuye en un orden secuencial desde las células de la granulosa mural (CGM), las CC y el ovocito; la difusión externa de cGMP finalmente

permite que el ovocito reinicie la meiosis (Pan y Li, 2019). En la Figura 1 se observa la interacción y regulación paracrina involucrada en el proceso de detención y reanudación meiótica entre las CGM, CC y el ovocito.

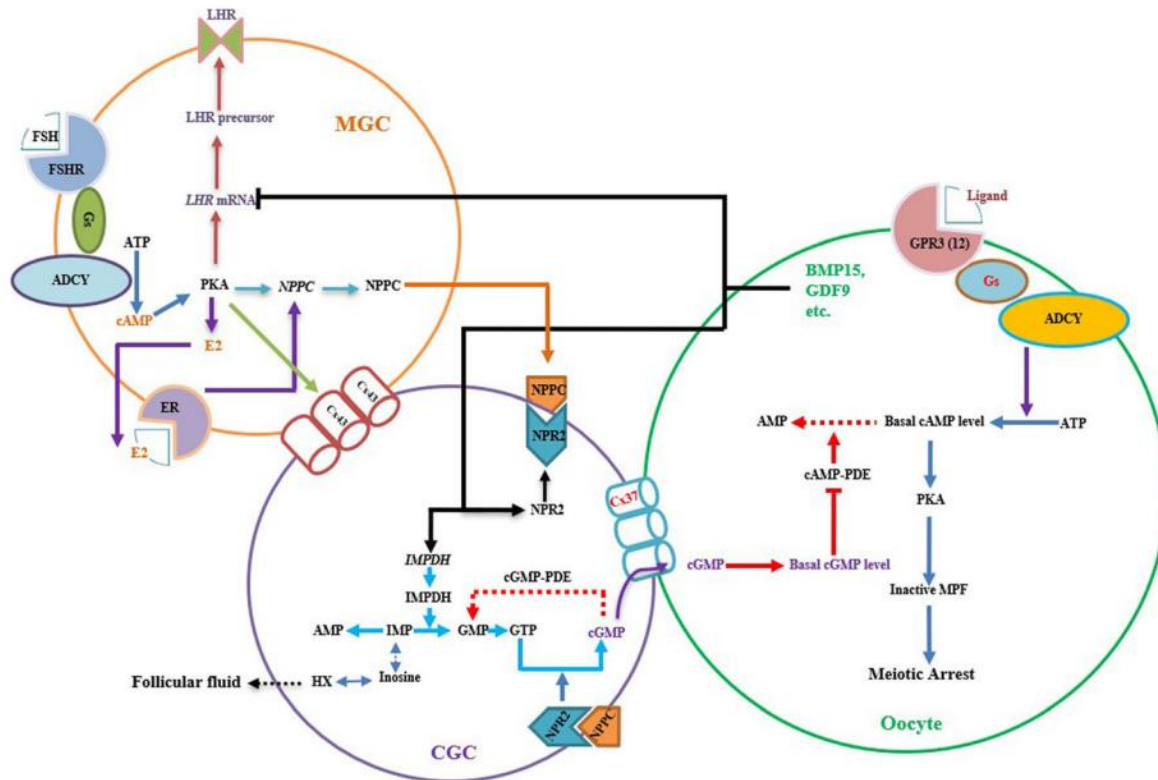


Figura 1. Interacción de las CGM y CC en el arresto meiótico del ovocito (Pan y Li, 2019). Una vía abreviada que describe la participación de FSH/FSHR, estrógeno/ER, NPPC/NPR2 y ovocitos en el mantenimiento de la detención meiótica de los ovocitos de mamíferos. En las células de la granulosa mural, la FSH se une a su receptor (FSHR), y la colaboración con la vía de la señal de estrógeno/ER provoca la producción de NPPC. En la célula del cúmulo granulosa, NPPC activa su receptor NPR2, convierte GTP en cGMP, luego el cGMP se difunde hacia el ovocito a través de uniones comunicantes (principalmente Cx37), inhibe la actividad de AMPc-PDE y bloquea la degradación del AMPc intraovocitario (Pan y Li, 2019).

Después de la ovulación, las CC continúan asociadas con el ovocito, facilitando la captura del COC por las células epiteliales ciliadas del infundíbulo y su transporte a lo largo de las trompas de Falopio. Con esto se tiene que la expresión genética y la

actividad bioquímica de las CC están influenciadas por la condición del ovocito, el entorno dentro del folículo y también las interacciones dentro del ovario (Huang y Wells, 2010; Tanghe et al., 2002). La estrecha comunicación entre las CC, el ovocito y las CG circundantes tiene relevancia en procesos reproductivos normales, los cuales se pueden ver alterados por agentes tóxicos y las alteraciones que estos pueden producir a nivel celular como daño al ADN, pueden repercutir de manera directa en el correcto desarrollo y la maduración de los ovocitos.

1.3 Daño al ADN

El daño al ADN es una forma de estrés celular definido como cualquier tipo de alteración en el ADN que interrumpe sus funciones principales (replicación y transcripción), si el daño ocurre en la línea germinal, puede provocar infertilidad o aberraciones cromosómicas y genéticas en el embrión en desarrollo (Martin, 2008 y Pailas et al., 2022).

Las modificaciones en el ADN pueden surgir por mecanismos endógenos del metabolismo o exógenos. El daño endógeno puede ser generado debido a la producción de ERO creadas fisiológicamente durante los procesos metabólicos celulares, o a través de la desaminación espontánea de bases, creación espontánea de sitios abásicos, errores y desajustes de replicación. El daño exógeno es causado por factores ambientales como la luz ultravioleta, agentes químicos o la radiación ionizante los cuales pueden interferir en procesos de transcripción y replicación, e inclusive pueden provocar un descontrol en la división celular (Basu, 2018). Las lesiones en el ADN pueden ocurrir espontáneamente o pueden estar causadas por la exposición a agentes mutagénicos. La desaminación, la depurinización y el daño oxidante de las bases nitrogenadas son algunos de los daños que se producen en el ADN de forma espontánea (Mena et al., 2013).

Algunos ejemplos de alteraciones estructurales del ADN son las roturas de una o dos hebras, reordenamientos genómicos, sitios abásicos, enlaces covalentes entre bases nitrogenadas en la misma hebra o en diferentes hebras, entrecruzamientos

entre ADN y proteínas, ADN de triple hebra, forma Z del ADN. También se propone que los desajustes de bases (antes de que se conviertan en alteraciones en el 'sentido' de la secuencia) constituyen alteraciones estructurales en el ADN (Chakarov et al., 2014).

Una vez que se reconoce el daño del ADN en el genoma nuclear, los aductos de ADN, las pequeñas lesiones de codificación errónea, las roturas de una cadena o las roturas de cadena doble no complejas pueden repararse directamente mediante reparación por escisión de nucleótidos, reparación por escisión de bases, reparación por recombinación homologa o unión de extremos no homólogos, respectivamente (Yousefzadeh et al., 2021).

En presencia de daños en el ADN no reparados, el ciclo celular se detiene mediante la activación de puntos de control de daños del ADN, el propósito es detener el ciclo celular mientras la célula repara las lesiones (Lemmens y Lindqvist, 2019). Aunque hay fuertes indicios de que la reparación del ADN se produce en los ovocitos, los procesos, mecanismos claros, la eficacia y la velocidad de la reparación en los ovocitos en comparación con las células somáticas aún están por dilucidar (Pailas et al., 2022).

Entre las técnicas para la evaluación del daño al ADN se encuentra la electroforesis unicelular en gel o ensayo cometa, el cual se lleva a cabo mediante la inclusión de las células en un microgel de agarosa situado sobre portaobjetos y aplicándoles una lisis alcalina o neutra. Los núcleos se someten a electroforesis en donde el ADN dañado migra a través de la agarosa el cual se tiñe con un fluorocromo, el bromuro de etidio. El ADN fragmentado avanza por acción del campo eléctrico y ofrece una imagen similar a la cola de un cometa que puede ser observada por microscopía de fluorescencia. Las células que no

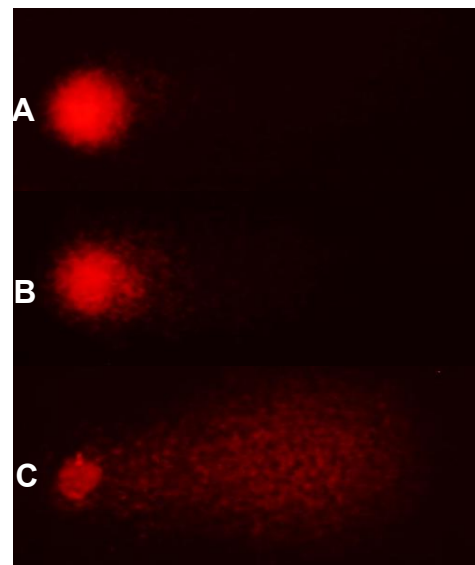


Figura 2. Imagen representativa de la extensión de la cauda del cometa (C) en presencia de daño en las cadenas de ADN. (Archivo personal).

presentan fragmentación no generan esta imagen (Álvarez et al., 2015), sin embargo, la extensión de la cauda del cometa estará en relación con la cantidad de fragmentación de las cadenas de ADN (**Figura 2**).

Es una técnica de alta sensibilidad, que hace posible medir los niveles de ruptura del ADN de cadena sencilla, doble o ambas (Valbuena et al., 2020).

1.4 Parabenos

Los PB fueron introducidos a mediados de la década de 1920 como conservantes en productos farmacéuticos. Actualmente, son conservantes ampliamente utilizados, principalmente en las industrias cosmética y farmacéutica, pero también en productos alimenticios y otros productos industriales. Además del agua, se consideran el ingrediente más común de los cosméticos (Błędzka et al., 2014).

Los PB son una serie homóloga de grupos derivados del ácido parahidroxi benzoico (PHBA), esterificados en la posición C-4 (incluidos metil-, etil-,

propil-, butil-, etil- y bencilparabeno), usados solos o en combinación para ejercer un efecto antimicrobiano (**Figura 3**). Los PB pueden tener múltiples acciones biológicas, pero generalmente se cree que sus efectos inhibidores sobre el transporte de membranas y los procesos de función mitocondrial son clave para sus acciones (Sabalitschka, 1930; Soni, 2005).

Las numerosas propiedades que predisponen a los PB para su uso como agentes conservantes han contribuido a su considerable popularidad. Las características que determinan la alta utilidad de los PB incluyen el amplio espectro de actividad contra levaduras, mohos y bacterias, una estabilidad química para un amplio intervalo de temperatura y pH que oscilan entre 4.5 y 7.5, bajos costos de

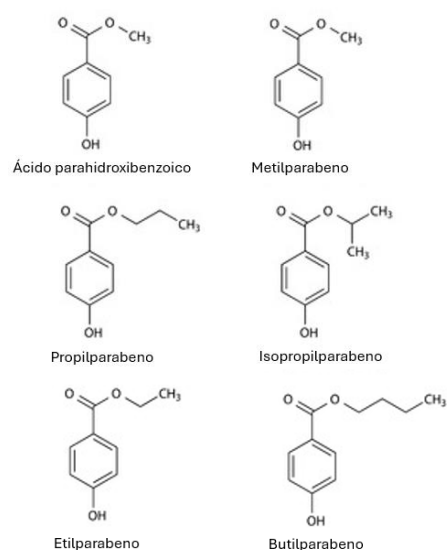


Figura 3. Estructura química de los PB (Boberg et al., 2010).

producción, así como no generar cambios en la consistencia o coloración de los productos, entre otros (Błędzka et al., 2014).

Una de las características de los PB es la cadena alquílica que poseen, que, entre otras cosas, determina la solubilidad que disminuye con la extensión de la cadena, al mismo tiempo que aumenta la estabilidad, el efecto antimicrobiano y la penetrabilidad celular. Por tanto, dado a que su principal aplicación es en medios acuosos, los PB con cadena alquílica más corta tienen mayor uso (Alampanos y Samanidou, 2021). En consecuencia, el metilparabeno (MePB) y el propilparabeno (PrPB) son los más utilizados, y a menudo, de manera conjunta (Alampanos y Samanidou, 2021; Vale et al., 2022).

El MePB es de los conservantes más utilizados en los cosméticos ya que cumple varios de los criterios de conservante ideal. Presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana, es incoloro, estable en todo el rango de pH, resistente a la hidrólisis en agua caliente y fría (autoclave) (Alexander et al., 1978), no es volátil, tiene una baja tendencia a la absorción en plásticos y materiales de embalaje primarios comúnmente utilizados, y es económico (Handa et al., 2006). Los PB, según la legislación de Estados Unidos de América, a través de la FDA, se pueden adicionar hasta el 0.1 % en los alimentos, el 0.1% para un solo análogo y del 0.3 % para los análogos mixtos en los productos farmacéuticos; Además, en Europa, se permite su uso al 0.4 % para un solo PB o al 0.8 % en total para los análogos mixtos (Wei et al., 2021).

El uso generalizado de PB en productos para el cuidado personal, alimentos y productos farmacéuticos da como resultado altas exposiciones a parabenos a través de una variedad de vías de ingreso, como la absorción dérmica, la ingestión e inhalación (Błędzka et al., 2014). En el cuerpo humano, los parabenos son metabolizados por las carboxilesterasas a ácido p-hidroxibenzoico, que se conjuga con sulfato, ácido glucurónico o glicina (ácido p-hidroxihipúrico) antes de ser excretado en la orina (Moos et al., 2015; Nowak et al., 2018).

Los PB aplicados por vía cutánea se absorben por la piel y son metabolizados por las esterasas. La absorción depende de la longitud de la cadena del éster y de la

formulación. En general, la permeación de la piel disminuye al aumentar la longitud de la cadena. Después de la absorción, los PB y sus metabolitos se conjugan y se excretan en la orina y la bilis (Boberg et al., 2010).

En muestras de sangre y leche materna se encontraron concentraciones de 0,62 ng/ml de MePB (Park et al., 2019), en tejido placentario concentraciones de hasta 11,77 ng/g de MePB (Valle-Sistac et al., 2016), concentraciones de EtPB entre 0,13 y 0,16 µg/L en muestras de sangre de cordón umbilical (Geer et al., 2017) lo que sugiere que los PB pueden atravesar la barrera hematoplacentaria.

Diversos estudios se han enfocado en estudiar el efecto del MePB por ser de los PB ampliamente utilizados, entre los efectos que se han podido determinar a nivel endocrino se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Efectos endocrinos del MePB.

Parabeno	Efecto endocrino	Sujeto de estudios	Referencia
MePB	Aumenta la concentración de globulina fijadora de hormonas sexuales.	Mujeres embarazadas	Aker et al., 2016
	Disminuye la actividad del estrógeno sulfotransferasa.	Queratinocitos epidérmicos humanos	Prusakiewicz et al., 2007
	Disminuye la actividad transcripcional inducida por la testosterona.	Células de riñón embrionario humano	Pop et al., 2016
	Disminuye la concentración de tiroxina.	Ratas	Vo et al., 2010

Adaptado de Nowak et al., (2018)

1.4.1 Parabenos y su efecto a nivel reproductivo

Los PB afectan el sistema endocrino por numerosos mecanismos, afectando los niveles de las hormonas sexuales esteroides, uniéndose a los receptores nucleares de las hormonas naturales y modulando la actividad de las enzimas que metabolizan hormonas naturales (aromatasa o sulfotransferasas) (Boberg et al., 2016; Jakopin, 2021). Adicional a esto diversos estudios epidemiológicos han demostrado los efectos nocivos de los PB en la salud humana; por ejemplo, disminución del número

de folículos antrales, niveles de estradiol y aumento de FSH (Jurewicz et al., 2020) y acortamiento del ciclo menstrual (Nishihama et al., 2016).

Se ha catalogado a los PB como disruptores endocrinos (DE) debido a sus efectos anteriormente descritos. Los DE son sustancias que afectan la síntesis, secreción, transporte, unión, acción, inactivación, metabolismo o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo. Estos DE tienen la capacidad de producir cantidades anormales de hormonas en circulación debido a sobreproducción en los órganos endocrinos, liberación excesiva de hormonas almacenadas, mayor expresión de enzimas sintéticas, disminución del metabolismo hormonal o una disminución de la tasa de eliminación y excreción de hormonas (Chou, 2024).

2. ANTECEDENTES

Se tiene conocimiento que después de la absorción de los PB en el torrente sanguíneo, se distribuye a los órganos, pero debido a la rápida hidrolización y conjugación, también se espera que las concentraciones de los compuestos originales sean muy bajas en los sitios activos de los órganos diana (Boberg et al., 2010). Sin embargo, a pesar de tener una adecuada absorción, conjugación y eliminación, el potencial de bioacumulación parece ser el responsable de los hallazgos reportados en diversos estudios, como los reportados por Gal et al., 2019 en ratones donde se estudio *in vitro* el efecto de PrPB a 100 µg/ml (555 µM) en folículos antrales donde encontraron que el PrPB inhibe el crecimiento del folículo antral, altera la capacidad esteroidogénica de los folículos antrales, e incrementa los niveles de reguladores tanto del ciclo celular como apoptóticos.

En el estudio realizado por nuestro grupo de investigación, Barajas-Salinas et al., (2020) reportó que concentraciones de 750 y 1000 µM de MePB en ovocitos porcinos expuestos *in vitro* afecta la viabilidad y maduración, además de que reduce la expansión de las CC y después de las 44 h de MIV altera el citoplasma (citoplasma retraído y con apariencia granular). Lo que afecta la calidad de los ovocitos expuestos ya que la expansión de las CC es un indicador de la calidad del ovocito madurado en estas condiciones (Nevoral et al., 2014; Barajas-Salinas et al., 2020).

Un estudio de exposición perinatal a BuPB realizado por Maske et al., (2018) demostró que este puede actuar como DE antiestrogénico y tiene efecto sobre la maduración sexual y el desarrollo reproductivo indicado por el retraso significativo en la edad de la apertura vaginal y reducción de la duración del ciclo estral en los grupos de 10 y 1000 mg/kg de peso corporal/día. Además, observaron aumento de la expresión del receptor de estrógenos alfa (ER α) en dosis de 100 y 1000 mg/kg de peso corporal/día, del receptor de estrógenos beta (ER β) y StAR en dosis de 100 mg/kg de peso corporal/día. Lo cual los llevó a concluir que esta alteración puede deberse a un efecto anti estrogénico del BuPB sobre la esteroidogénesis ovárica y la foliculogénesis.

Por otro lado, Yan et al., (2022) demostraron que la exposición crónica a PrPB en dosis relevante para el ser humano (7,5 mg/kg/día) afectó negativamente la reserva ovárica y la función endocrina en ratones adultos. Donde el envejecimiento ovárico inducido por el PrPB se puede dar a través de la disfunción de la esteroidogénesis dependiente de la vía de señalización MAPK mediada por el estrés oxidativo y el reclutamiento de folículos primordiales dependiente de la vía de señalización PI3K/AKT.

Ziv-Gal et al., (2021) al evaluar el efecto del MePB y PrPB en células epiteliales oviductales, encontraron que los PB interrumpen la progresión del ciclo celular, afectan la expresión de factores apoptóticos y de los receptores nucleares esteroidogénicos; ya que estos dos PB regularon a la baja los niveles del receptor de progesterona.

Smith et al., (2013) asociaron las concentraciones de PB en la orina con los marcadores de reserva ovárica en un estudio clínico de cohorte prospectivo de mujeres que buscaban tratamiento de fertilidad, y encontraron que la exposición a PrPB puede provocar disminución de la reserva ovárica y contribuir al envejecimiento de los ovarios. De manera similar Jurewicz et al., (2020) evaluaron la asociación de las concentraciones de PB en orina con parámetros de reserva ovárica entre mujeres en tratamiento de una clínica de fertilidad, encontrando que, las concentraciones de PrPB en la orina se asocian con disminución del número de

folículos antrales y de los niveles de estradiol así como un aumento en las concentraciones de FSH. Sugiriendo así que la exposición crónica a PrPB puede contribuir potencialmente a reducir la fecundidad y afectar la fertilidad.

Uno de los efectos de los PB como DE fue demostrado con experimentos en ratas, los cuales demostraron que el BuPB contribuye a disminuir en la expresión del gen *CYP19a1*, lo que resultó en la alteración de los niveles de andrógenos y estrógenos, ya que este codifica a la enzima aromatasa, encargada de catalizar la conversión de andrógenos a estrógenos (Boberg et al., 2016).

Recientemente, un estudio realizado por Hu et al., (2023) en peces cebra adultos evidenció que a concentraciones ambientalmente realistas de MePB (10 µg/L) durante 28 días se encontraron efectos de DE y deterioro reproductivo, los cuales se manifestaron con un bloqueo evidente de la espermatogénesis y la ovogénesis en las gónadas de estos peces.

3. JUSTIFICACIÓN

Los COC forman la sinergia para que se pueda llevar a cabo de manera exitosa el desarrollo, maduración y crecimiento de los ovocitos, para así garantizar que sean aptos en el proceso de fertilización. En este proceso las CC contribuyen al desarrollo y la maduración del ovocito y a su vez, este responde y regula su entorno en conjunto con las CC para garantizar que las condiciones sean propicias para su crecimiento.

Dada la importancia de las CC en el proceso de desarrollo, maduración y ovulación del ovocito, y basados en estudios previos del efecto toxicológico que causan los PB en las células como DE y generadores de ERO, en este proyecto buscó determinar los efectos de la exposición al MePB en la integridad del ADN de las CC y su influencia como un factor que deteriora la calidad de los ovocitos porcinos, resaltando su relevancia debido a la ausencia de estudios enfocados en evaluar el daño que pueden estar causando los PB directamente en las CC.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los efectos del MePB en la integridad del ADN de las CC y su relación con la calidad del ovocito?

5. HIPÓTESIS

La exposición de los COC a diferentes concentraciones de MePB alterará la integridad del ADN de las CC, por lo que se producirá una disminución de la viabilidad y maduración de los ovocitos porcinos, por el papel fundamental que las CC tienen durante su desarrollo y maduración.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la exposición de los COCs porcinos a concentraciones de 500, 750 μM y 1000 μM de MePB afecta la integridad del ADN de las CC.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del MePB en la viabilidad de las CC de COCs expuestos.
- Evaluar si el MePB altera la maduración y viabilidad de los ovocitos expuestos.
- Evaluar el efecto del MePB en la integridad del ADN de las CC de los ovocitos.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Evaluación del efecto del MePB sobre la viabilidad y MIV de los ovocitos, e integridad del ADN y viabilidad de las CC.

Se realizaron tres grupos aleatorios de al menos 50 COCs cada uno para evaluar el efecto de tres diferentes concentraciones de MePB (500, 750 y 1000 μM) junto con un grupo control (sin tratamiento, 0 μM) posteriormente se determinó el efecto sobre la viabilidad y la MIV de los ovocitos, así como de la viabilidad y el daño al ADN de las CC (**Figura 4**). Las concentraciones de MePB que se emplearon en el presente

diseño se basaron en las reportadas por Barajas-Salinas et al., (2020), quienes determinaron que el MePB a concentraciones subletales de 500, 750 y 1000 μM provocaron disminución en la maduración y viabilidad de los ovocitos porcinos.

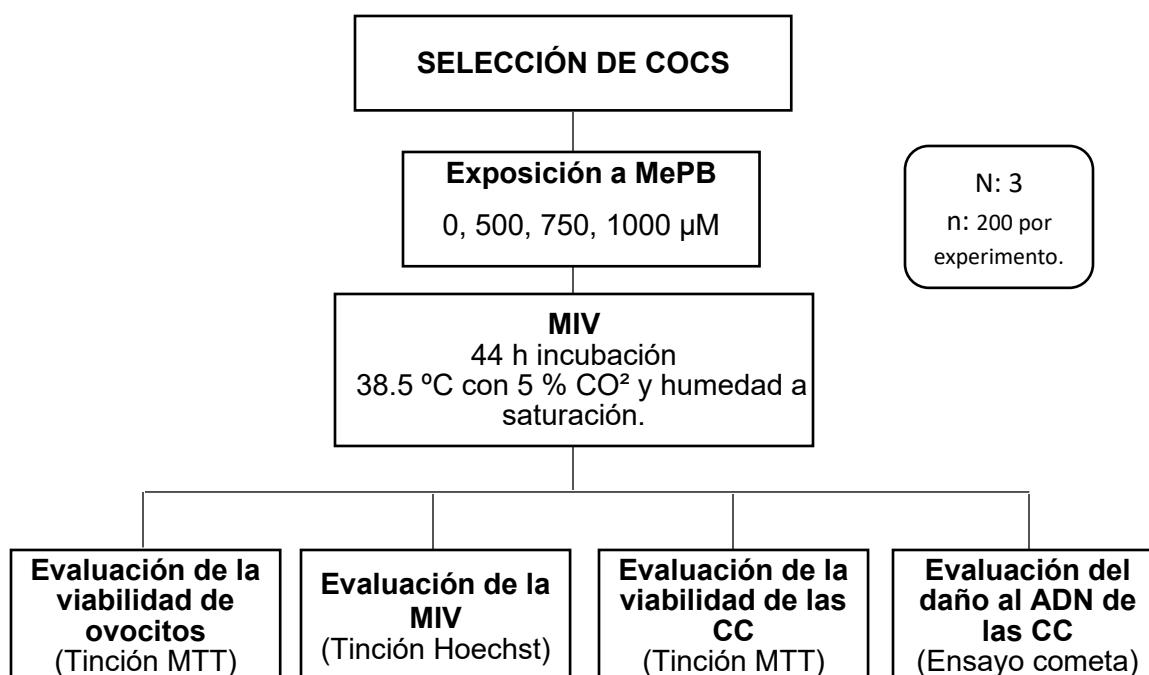


Figura 4. Diseño experimental.

N: número de repeticiones. n: tamaño de la muestra.

8. METODOLOGÍA

La metodología de colecta de ovocitos, tratamiento con MePB y MIV utilizada se basó en lo descrito por Barajas-Salinas, et al., 2020.

Todos los reactivos utilizados durante el estudio fueron de la marca Sigma-Aldrich (Merck), al menos que se indique lo contrario.

8.1 Tratamiento con MePB

Se empleó MePB (methyl 4-hydroxybenzoate), con PM 152.15 y CAS Número: 99-76-3.

Para preparar el MePB se llevó a cabo su disolución y dilución con medio de maduración (TCM-199, *In Vitro* México). Se preparó una solución 16.4 mM de MePB, a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones finales de 500, 750 y 1000 μ M.

Para la exposición de los COCs a MePB, estos se agregaron en las concentraciones antes descritas, en una caja de cultivo de 4 pozos durante las 44 h de MIV.

8.2 Maduración *in vitro*

En las instalaciones del rastro los Arcos en el Estado de México se colectaron ovarios de cerdas prepúberes F1 Landrace X Yorkshire de aproximadamente 6 meses de edad. Los ovarios fueron transportados al laboratorio en solución 0.157 M de NaCl, a temperatura entre 25–28 °C. El primer paso fue realizar la punción de los folículos ováricos aptos para colectar el fluido folicular, para lo cual se seleccionaron los que median entre 3 y 6 mm. Se puncionaron usando una aguja de calibre 18 con jeringa desechable de 10 mL, para la obtención del fluido folicular que contenía a los COCs. El fluido folicular colectado se dejó sedimentar por 20 min en un tubo de 50 mL. El paquete celular se lavó en tres tiempos de 15 min cada uno, en donde se agregaron 20 mL de la solución de Tyrode suplementada con 10 mM de lactato de sodio, 0.50 mM de HEPES y 0.01 % de polivinil alcohol (TL-HEPES PVA) a pH de 7.3 – a 7.4.

El paquete celular se colocó en cajas Petri de 35mm para seleccionar aquellos COCs que presentaban un citoplasma uniforme y al menos tres capas de CC. Posteriormente se lavaron tres veces para retirar restos celulares en 500 μ L de medio TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (*In vitro*, México) suplementado (glucosa 3 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, alcohol polivinílico 0.1% v/v, cisteína 0.57 mM, EGF 10 ng/mL, penicilina 75 μ g/mL, estreptomycin 1 μ g/mL). Se cultivaron 50 COCs por pozo, en cajas de 4 pozos que contenían 500 μ L de

medio de maduración TCM-199 suplementado, previamente cubierto con aceite mineral e incubado a 38.5 °C con 5 % de CO₂ y humedad a saturación; finalmente se añadieron 5 µg/mL de FSH y 5 µg/mL de LH y se dejaron a incubación por 44 h (Ducolomb et al., 2009; Barajas-Salinas et al., 2020).

8.3 Evaluación de la viabilidad y MIV

La evaluación de la viabilidad y de la MIV se realizó en el mismo ovocito mediante una técnica de doble tinción con metil tetrazolio (MTT) (5 mg/mL) para viabilidad y bisbenzimidida (Hoechst 33258) (45 µg/mL) para maduración.

Se incubaron los COCs en MTT por 30 min. Los ovocitos y CC incoloros se clasificaron como muertos y los teñidos de color púrpura como vivos. La evaluación de la viabilidad se realizó antes de la tinción con Hoechst, utilizando un microscopio estereoscópico. Posteriormente, para evaluar las etapas de la maduración nuclear los mismos ovocitos fueron teñidos con Hoechst 33258 en PBS aislados de la luz a 4 °C durante 40 min, posteriormente se fijaron con glutaraldehído al 2 % por 20 min y se realizó el montaje sobre un portaobjetos con glicerol-PBS (1:9). Los criterios para la evaluación de la maduración nuclear fueron los siguientes: ovocitos con vesícula germinal (VG): inmaduros; en MI: en vías de maduración; en MII: maduros (Casas et al., 2010; Barajas-Salinas et al., 2020).

8.4 Evaluación de la integridad del ADN (Ensayo cometa)

El daño al ADN generado por la exposición a MePB se evaluó en las CC mediante electroforesis unicelular en gel en condiciones alcalinas (ensayo cometa) siguiendo el protocolo de Einaudi et al., 2013 y López et al., 2021. Se preparó agarosa de bajo punto de fusión (0.5 %) y de punto de fusión normal (0.1 %) diluido en PBS (NaCl al 0.8 %, KCl al 0.02 %, KH₂PO₄ al 0.02 % y NaH₂PO₄ al 0.15 % en agua destilada). Se utilizaron portaobjetos esmerilados para dar soporte a la agarosa de punto de fusión normal en la que se sumergieron y se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 24 h hasta su solidificación.

Las CC se obtuvieron del medio de maduración posterior a la denudación de los ovocitos, se clasificaron en 5 grupos: control, los tratamientos con las

concentraciones de MePB (500, 750 Y 1000 μ M) y un control positivo a daño con peróxido de hidrogeno (H_2O_2 al 0.3%). Las CC se resuspendieron en la agarosa de bajo punto de fusión y se extendieron sobre portaobjetos previamente tratado con agarosa de punto de fusión normal, se mantuvieron a 4 °C en oscuridad durante 10 min y posteriormente se añadió otra capa de agarosa de bajo punto de fusión. Los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis (NaOH, EDTA, TRIS, NaCL) durante 24 h a 4 °C y protegidos de la luz.

Posteriormente se colocaron en la cámara de electroforesis horizontal y se equilibraron en solución amortiguadora durante 15 min. Después se realizó la electroforesis a 25 V y 300 mA durante 15 min. Al término de la electroforesis, las preparaciones se neutralizaron en solución de Tris (0.4 M) durante 10 min. Finalmente se sumergieron en etanol al 70 % durante 5 min para deshidratarlas y se dejaron secar a temperatura ambiente durante mínimo 3 h hasta su evaluación.

Para evaluar la integridad del ADN, las preparaciones se colocaron sobre papel absorbente húmedo y se tiñeron con 50 μ L de bromuro de etidio (20 μ L/mL) durante 10 min (Berthelot-Ricou et al., 2011), luego se analizaron al microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axiostar) con el filtro Tex Red (561 o 594 nm) observando y capturando imágenes de los cometas a 40x. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa OpenComet las cuales analizaron con el software Image J OpenComet plugin para Windows 11 que permitió evaluar el daño al ADN. Las evaluaciones de la genotoxicidad celular se obtuvieron mediante cuatro parámetros:

- a) Longitud de la cola del cometa (CTL). Se refiere a la extensión del daño en el ADN y está dado en micrómetros.
- b) ADN de la cabeza del cometa (%). Se refiere al porcentaje de integridad del ADN.
- c) ADN de la cauda del cometa (%). Indica el porcentaje de fragmentación del ADN.
- d) El “momento de la cauda de Olive (OTM, por sus siglas en inglés), producto del % de ADN en la cauda y la distancia entre los centros de masa de las regiones de la cabeza y la cauda.

El OTM es proporcional al daño genotóxico (a mayor OTM el daño genotóxico es superior) y es de las medidas más confiables y representativas para evaluar el daño al ADN celular (López et al., 2021).

8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los datos obtenidos de las cuatro variables aleatorias dependientes se aplicaron pruebas estadísticas para la distribución normal junto con el coeficiente de asimetría y curtosis. Para los resultados de viabilidad y maduración de los ovocitos, así como de la viabilidad de los COCs se realizó una prueba de hipótesis de Kruskal-Wallis para determinar si al menos un grupo es diferente y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's. Para la evaluación del daño al ADN mediante el ensayo cometa los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de comparaciones múltiples, de Tukey. En cada prueba se consideró $p < 0.05$ como diferencia significativa.

9. RESULTADOS

9.1 Viabilidad de ovocitos porcinos y células del cúmulo

La viabilidad fue evaluada mediante la tinción de MTT posterior a la incubación de los ovocitos que cumplían con las características óptimas para ser sometidos a las 44 h de maduración (citoplasma uniforme y al menos tres capas de células del cúmulo) (**Figura 5**). La **Figura 6** muestra la evaluación de la viabilidad de los ovocitos colectados. Se realizaron tres experimentos con un promedio de 200 ovocitos distribuidos en 4 pozos. Para la viabilidad de los COCs se consideraron tres criterios de evaluación: OV-CG: ovocito vivo, CC vivas; OV-CM: ovocito vivo, CC muertas y OM-CM: ovocito muerto, CC muertas como se observa en la **Figura 7**. No se observaron patrones de ovocitos muertos con CC vivas.

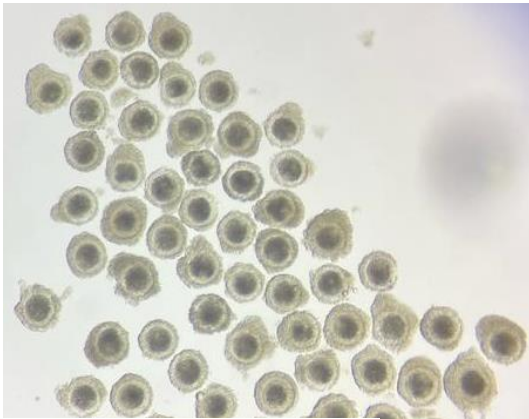


Figura 5. Selección de COCS.

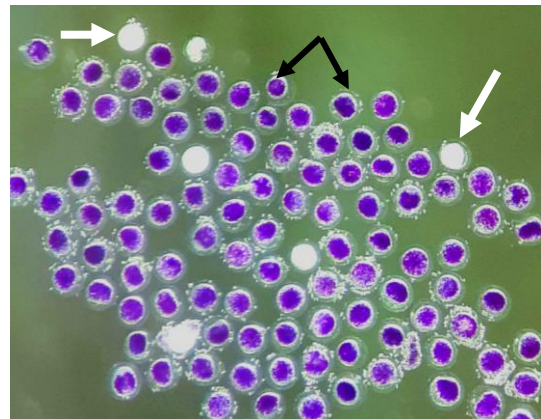


Figura 6. Evaluación de viabilidad con MTT.

Flecha azul: Ovocitos incoloros no viables
Flecha negra: Ovocitos morados viables

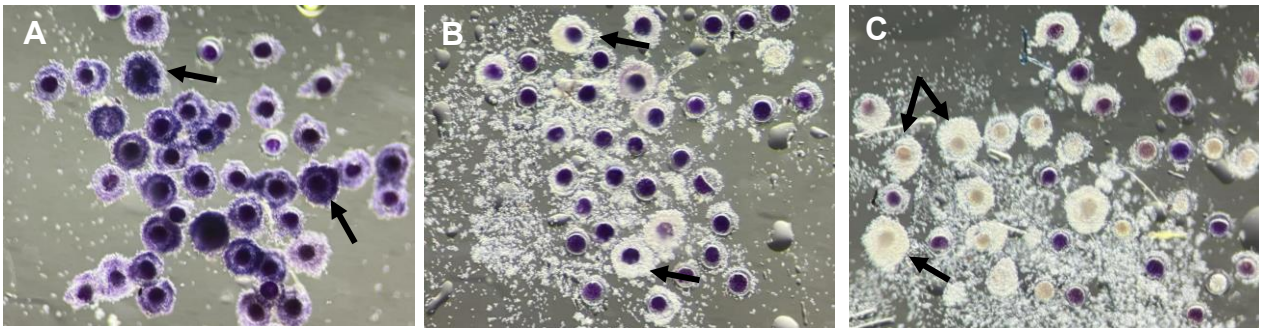


Figura 7. Tinción de MTT para viabilidad de COCs.

A. Ovocito vivo - CC vivas (OV-CV) B. Ovocito vivo - CC muertas (OV-CM) C. Ovocito muerto - CC muertas (OM-CM).

Se evaluó el efecto del MePB determinando el porcentaje de viabilidad de los ovocitos expuestos utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con una $N=3$ y un análisis *post hoc* de Dunn's. Como se observa en la **Figura 8**, existen diferencias significativas a una $p<0.05$; media \pm EE, en la concentración de 1000 μ M de MePB con respecto al grupo control.

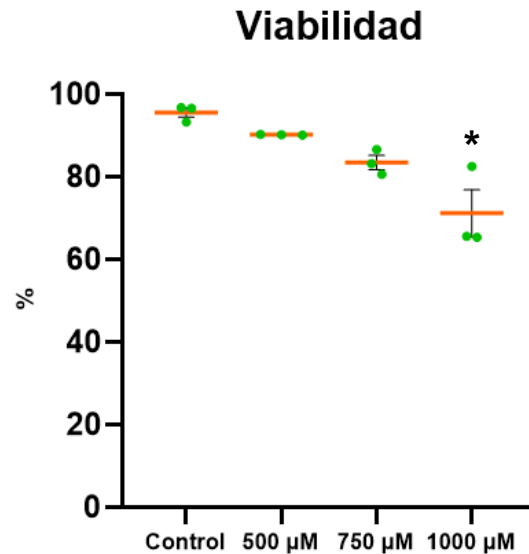


Figura 8. Viabilidad de ovocitos de cerdo madurados *in vitro* expuestos a diferentes concentraciones de MePB. Los datos se presentan como media \pm EE. *Presenta diferencias significativas vs. control, considerando $p < 0.05$.

La viabilidad de las CC se evaluó realizando la tinción de MTT en los COCs, los resultados se describen en la **Figura 9**, donde se observan las gráficas e imágenes representativas para cada grupo evaluado. El análisis de los datos se realizó utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con $N=3$ y un análisis *post hoc* de Dunn's. Se encontraron diferencias significativas en el tratamiento de 1000 μ M con respecto al grupo control en el parámetro de OV-CV; entre el grupo de 750 μ M y el grupo control se encontraron diferencias significativas en el parámetro de OV-CM; finalmente en el parámetro de OM-CM se encontraron diferencias significativas entre el grupo de 1000 μ M y el grupo control. Lo que muestra el daño concentración dependiente en los COCs, y de manera sobresaliente, la tendencia de las CC a presentar menor viabilidad en comparación a los ovocitos.

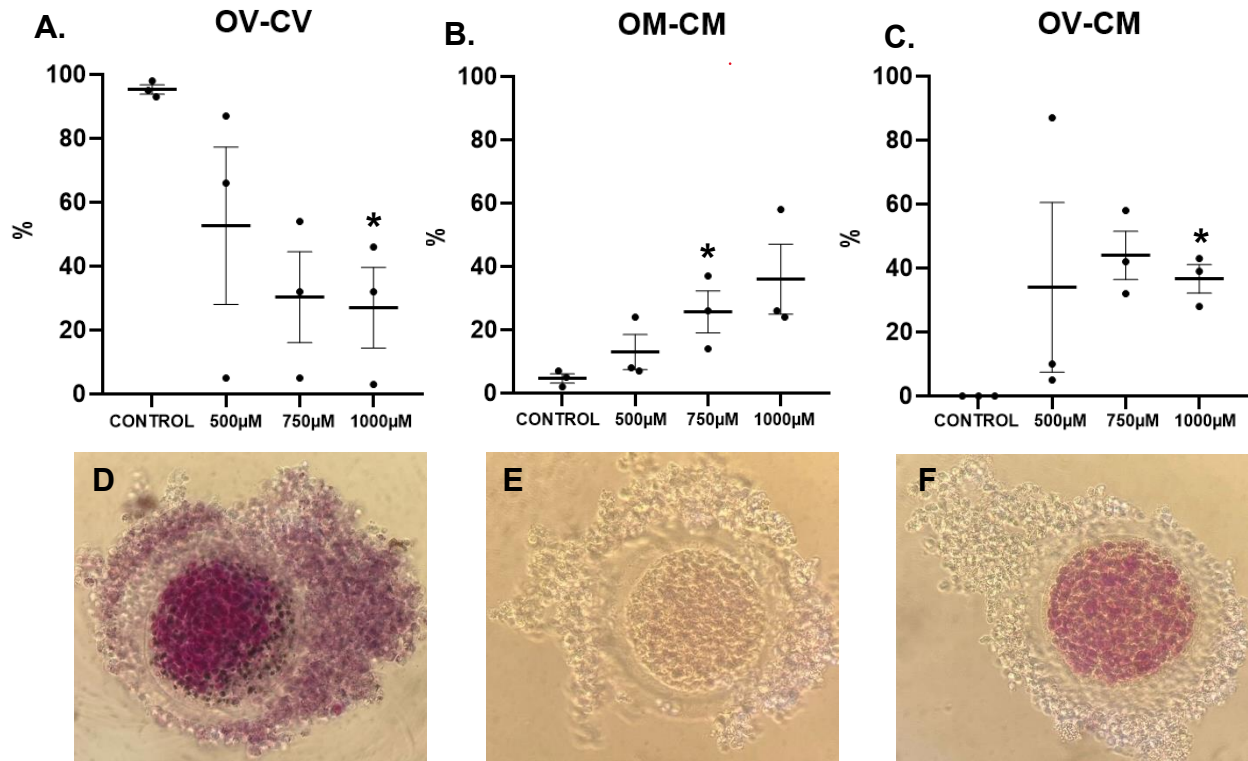


Figura 9. Viabilidad de las CC. La cual se encuentra graficada (A,B,C) y representada en imágenes (D, E, F) en la clasificación designada para su evaluación (OV-CV, OV-CM, OM-CM). Los datos se presentan como media \pm EE. *Diferencias significativas vs control, considerando $p < 0.05$.

9.2 Maduración *in vitro* de ovocitos porcinos

En la **Figura 10** se muestran los criterios de clasificación de los estados de maduración nuclear de los ovocitos de los diferentes grupos.

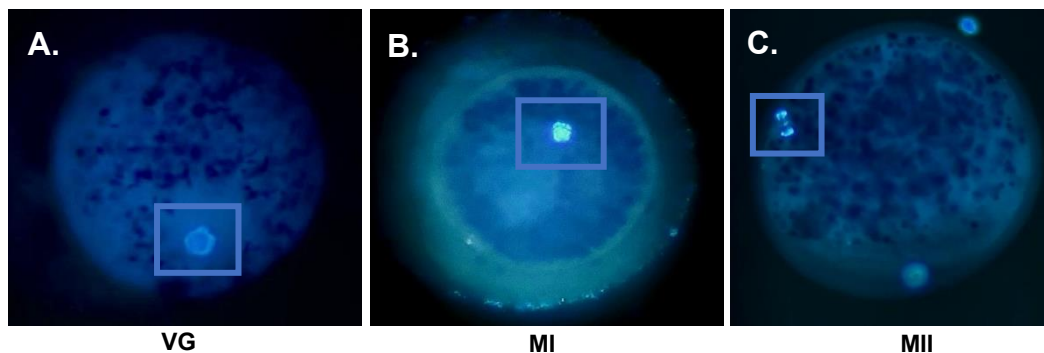


Figura 10. Evaluación del estado de maduración nuclear.
 A. Ovocito en vesícula germinal (inmaduro). B. Ovocito en metafase I (en vía de maduración).
 C. Ovocito en metafase II (maduro).

Se evaluó el efecto del MePB determinando el porcentaje de maduración en las diferentes etapas de maduración (**Figura 11 a 13**) de los ovocitos expuestos utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con $N=3$ y el análisis *post hoc* de Dunn's. Como se puede observar en la **Figura 11 y 12** que evalúan los estados de maduración VG y MI hay una tendencia al aumento de ovocitos que se quedan inmaduros, pero no se encontraron diferencias significativas. En la **Figura 13**, existen diferencias significativas a una $p < 0.05$; media \pm EE, en la concentración de $1000\mu\text{M}$ de MePB con respecto al grupo control donde el valor de $p=0.0393$.

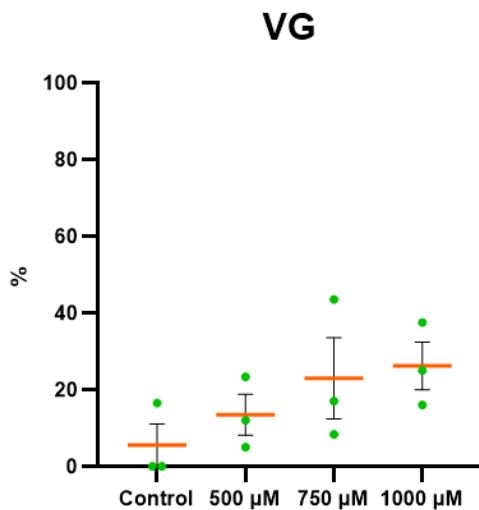


Figura 11. Ovocitos de cerdo madurados *in vitro* expuestos a diferentes concentraciones de MePB en estado de vesícula germinal. No se encontraron diferencias significativas.

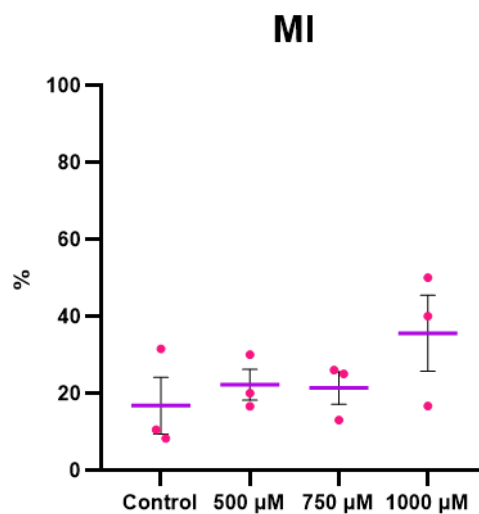


Figura 12. Ovocitos de cerdo madurados *in vitro* expuestos a diferentes concentraciones de MePB en estado de MI. No se encontraron diferencias significativas.

MII

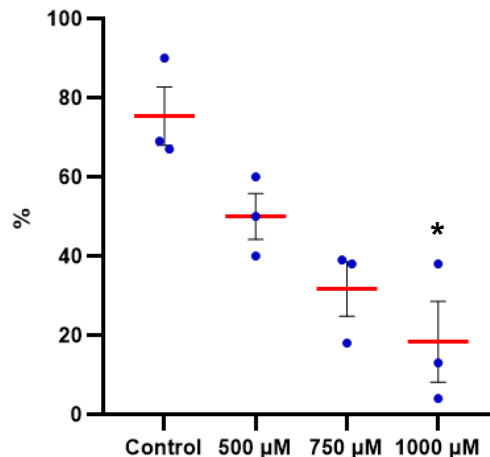


Figura 13. Ovocitos de cerdo madurados *in vitro* expuestos a diferentes concentraciones de MePB en estado de MII. Los datos se presentan como media \pm EE. *Se encontraron diferencias significativas vs control, considerando la $p < 0.0393$.

9.3 Daño a la cromatina de ovocitos porcinos

Posterior a la MIV y tinción con Hoechst se evidenció un aumento en el número de ovocitos dañados, esto fue consecuente con el aumento en la concentración del MePB, donde en las dosis más altas (750 μ M y 1000 μ M) se observa daño en la cromatina, **Figura 14**.

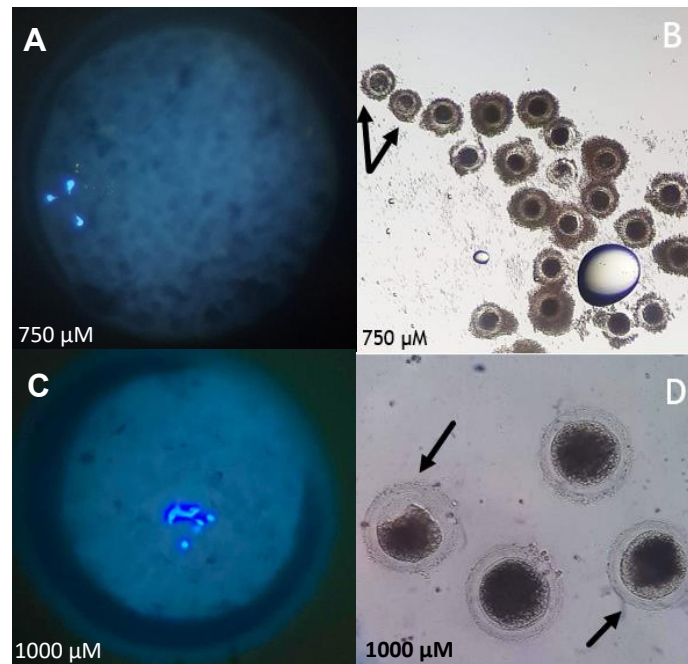


Figura 14. Ovocitos de cerdo madurados *in vitro* expuestos a diferentes concentraciones de MePB donde se observa el daño a cromatina en ovocitos (A,C), alteraciones citoplasmáticas y disminución en la expansión de las CC (B,D).

Al realizar el análisis estadístico en el cual se realizaron las pruebas Kruskal-Wallis y *post hoc* de Dunn's se observa una tendencia en el aumento de ovocitos con daño en la cromatina con respecto al aumento de la concentración de MePB. Sin embargo, solo se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y 1000 μ M con una $p= 0.0317$ **figura 15**.

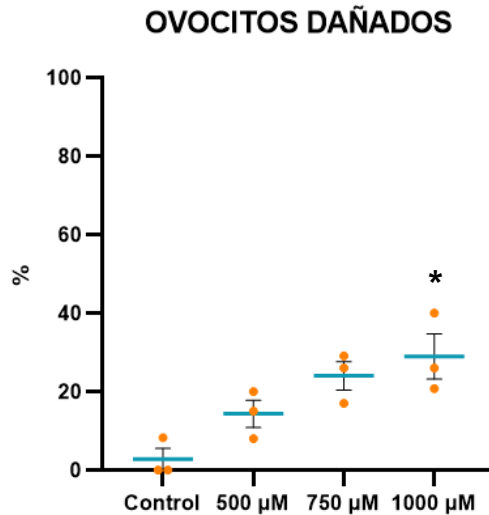


Figura 15. Ovocitos de cerdo madurados *in vitro* expuestos a diferentes concentraciones de MePB donde se evidencia daño en la cromatina. Los datos se presentan como media \pm DE. *Se encontraron diferencias significativas vs control, considerado la $p > 0.05$.

9.4 integridad del ADN de las células del cúmulo

Se evaluó el efecto del MePB en la integridad del ADN mediante la electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa) con cuatro patrones de medición obtenidos por el software OpenComet, los cuales son: Longitud de la cauda del cometa (CTL), ADN de la cabeza y cauda del cometa y el tiempo momento (OTM) representados en la **Figura 16 A**. El análisis estadístico realizado fue un ANOVA de una vía y un análisis *post hoc* con la prueba de Tukey. Los datos se presentan como media \pm DE. *Se encontraron diferencias significativas vs control, considerado la $p < 0.05$.

Las gráficas de la **Figura 16** muestran los resultados del análisis estadístico realizado. En la **Figura 16 B** se evalúa la longitud de la cauda del cometa, donde se observa un incremento de la longitud en los tratamientos y del control positivo a daño (H_2O_2 al 0.3%). El grupo H_2O_2 presenta los valores más altos seguido del grupo de 1000 μM . Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento con el grupo control ($F = 20.46$). El control positivo (H_2O_2) obtuvo una $p < 0.0001$ al igual que los tratamientos: 500 μM ($p < 0.0001$), 750 μM ($p < 0.0001$) y 1000 μM ($p < 0.0001$).

En la **Figura 16 C** se evaluó el OTM, donde se observa un incremento en los valores de los tratamientos y del control positivo. El control positivo presenta los valores más altos seguido del grupo de 500 μM . Se encontraron diferencias significativas entre tres de los grupos de tratamiento con el grupo control ($F= 7.158$) donde el control positivo obtuvo una $p < 0.0005$ al igual que los otros grupos tratamiento: 500 μM ($p < 0.0001$), 750 μM ($p < 0.00435$) y 1000 μM ($p < 0.0009$).

En la **figura 16 D** se presentan los resultados del % de ADN de la cabeza, donde se observa una disminución en el porcentaje de ADN en los tratamientos con PB y el control positivo. El control positivo presenta los valores más bajos seguido del grupo de 1000 μM y el grupo control representa los valores más altos ya que representa el porcentaje de ADN íntegro presente en la cabeza del cometa, esto quiere decir que a mayor porcentaje se presenta mayor integridad del ADN en la cabeza, lo que coincide con el efecto esperado en el control. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento con el grupo control ($F= 96.27$), el control positivo obtuvo una $p < 0.0001$ al igual que los otros grupos tratamiento: 500 μM ($p < 0.0001$), 750 μM ($p < 0.0001$) y 1000 μM ($p < 0.0001$).

En la **figura 16 E** se evaluó el porcentaje de ADN en la cauda del cometa, donde se observa un aumento del daño en el ADN en los tratamientos y en el control positivo. Este último presenta los valores más altos seguido del grupo de 1000 μM . El grupo control presenta los valores más bajos ya que en condiciones normales no debe haber cola en el cometa debido a la ausencia de daño. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento con el grupo control ($F= 96.72$), el control positivo obtuvo una $p < 0.0001$ al igual que los otros grupos tratamiento: 500 μM ($p < 0.0001$), 750 μM ($p < 0.0001$) y 1000 μM ($p < 0.0001$).

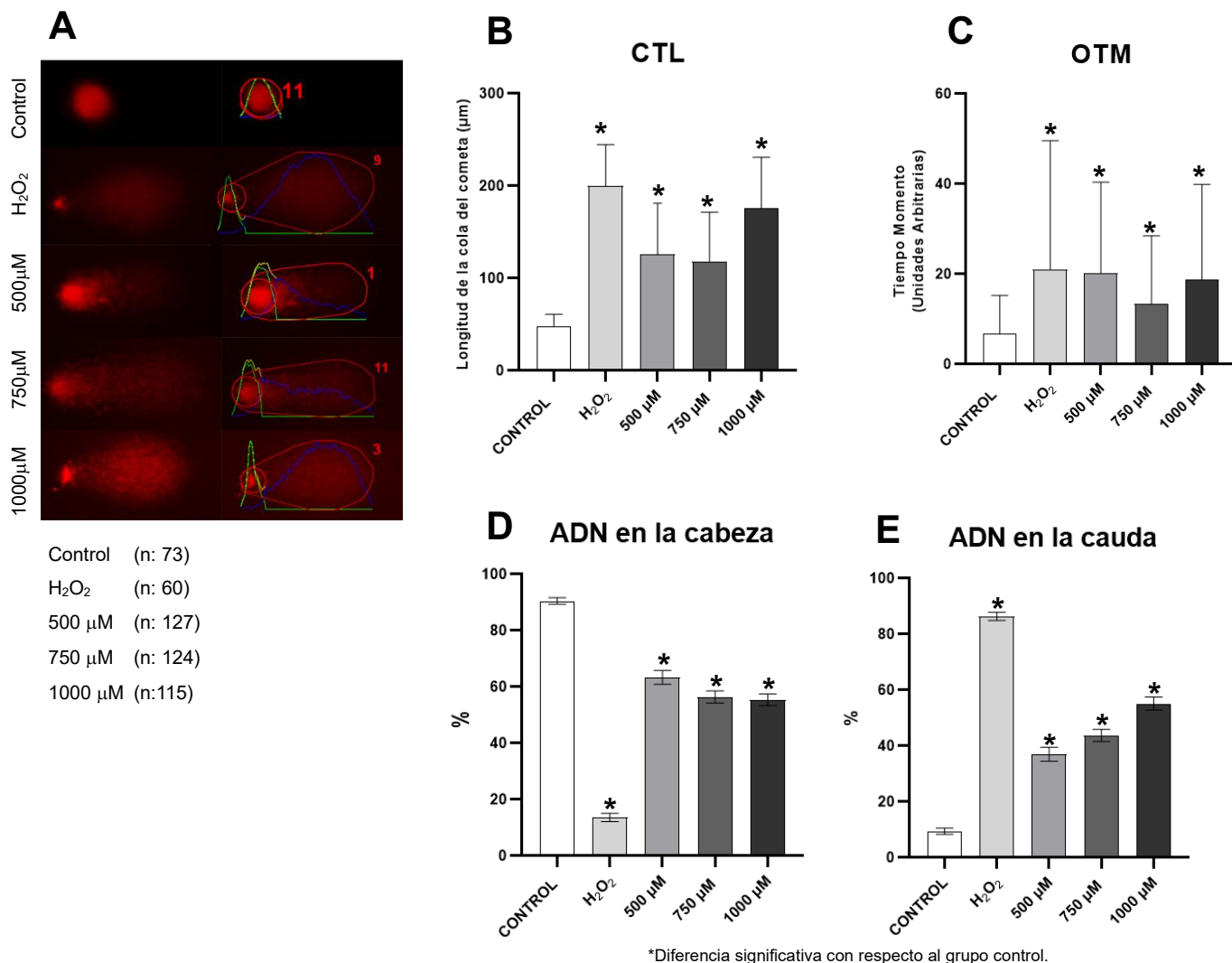


Figura 16. Daño al ADN generado en las CC de ovocitos porcinos expuestas a diferentes concentraciones de MePB.

(A) imagen representativa del daño al ADN generado por el MePB en las células del cúmulo en el grupo control, control positivo (H_2O_2), y concentraciones de 500, 750 y 1000 μM de MePB. Tinción con bromuro de etidio con microscopio de fluorescencia. En el grupo control se observaron células sin daño al ADN, pero en el control positivo y tratamientos con MePB, los cometas muestran daño en el ADN.

(B) En la longitud de la cola del cometa se obtuvo un porcentaje más alto en el grupo de H_2O_2 y 1000 μM consecuente con el daño genotóxico que realiza el MePB, se observaron diferencias significativas en todos los grupos con respecto al grupo

control. **(C)** La evaluación del OTM es uno de los indicadores principales de daño genotóxico, se observa como aumenta en el grupo de H₂O₂ y en los tratamientos donde se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control. **(D, E)** el porcentaje de ADN de la cabeza muestra una disminución en el grupo de H₂O₂ y los grupos tratados de manera gradual, a medida que aumenta el porcentaje de ADN en la cola respectivamente, haciendo notorio el corrimiento del ADN por la electroforesis. *Se encontraron diferencias significativas vs. control, considerado p < 0.05.

10. DISCUSIÓN

El uso indiscriminado de PB se ha visto reflejado en la presencia de PB en recursos hídricos, como aguas subterráneas, aguas residuales domésticas, aguas industriales e incluso de mar, en un amplio intervalo de concentraciones (del orden de ng/L a mg/L) y han generado grandes preocupaciones ambientales (Heo et al., 2023). Los PB por estar presentes en las formulaciones de productos de uso diario como champús, jabones y gel de ducha contaminan estas fuentes ocasionando múltiples daños a organismos acuáticos y de consumo humano, como son los peces. Estos daños también podrían producirse en otros organismos como los humanos debido a que estamos expuestos diariamente al uso de productos que contienen PB. Los PB han sido catalogados como DE por los efectos generados en los organismos sometidos a experimentos *in vitro* e *in vivo*, éstos representan un problema a mayor escala por la gran exposición diaria ya que se encuentran en productos cosméticos, farmacéuticos, conservantes de alimentos, entre otros. La mayoría de los estudios toxicológicos previos sobre MePB se han centrado en su efecto potencial como DE al activar selectivamente los receptores de estrógeno e inducir la secreción de estradiol. El MePB exhibe una actividad estrogénica basada en evidencias *in vitro* e *in vivo* (Hu, et al., 2023; Elsehly et al., 2022; Bereketoglu y Pradhan, 2019; Watanabe et al., 2013). Por lo tanto, dada la relevancia de estudios encontrados en PB es importante profundizar en otras vías por las cuales los PB están generando efectos en los organismos y descifrar los mecanismos de acción

principales por los cuales se afectan los sistemas celulares de los organismos expuestos a concentraciones biológicamente relevantes.

10.1 Alteraciones en la viabilidad, MIV y cromatina de ovocitos porcinos

La determinación de la viabilidad y MIV de los ovocitos expuestos al MePB permite tener resultados sobre el efecto directo en el gameto femenino y como, mediante diversas rutas fisiológicas, altera su viabilidad y maduración. Los resultados de viabilidad y MIV de este estudio corroboran lo descrito por Barajas-Salinas et al., 2020, donde se evidenció una disminución de la viabilidad de los ovocitos de manera concentración dependiente y se determinó que la concentración letal 50 (CL50) es de

2028 μM . Las concentraciones empleadas en este estudio fueron subletales (500, 750 y 1000 μM), que, si bien no presentan daños citotóxicos en la viabilidad, estos producen alteraciones a nivel fisiológico de los ovocitos. En este estudio la exposición a 1000 μM de MePB generó una disminución en la viabilidad de los ovocitos, donde también fue posible observar alteraciones a nivel citoplasmático, daño a la cromatina y disminución notoria en la expansión de las CC. Esto se relaciona con lo descrito por Barajas-Salinas et al., 2020, donde a partir de 750 μM y 1000 μM , se observaron cambios citoplasmáticos en los ovocitos y disminución en la expansión de las CC.

En cuanto a los resultados de MIV, en este estudio se encontró que a la concentración de 1000 μM , esta disminuye hasta un 20%. Estos resultados coinciden con Barajas-Salinas et al., 2020, en donde reportan la disminución de la MIV a partir de 750 μM de MePB en un 30%. Con lo anterior podemos decir que el MePB tiene un mayor efecto a nivel de la MIV que la viabilidad.

De manera similar, el estudio realizado por Jeong et al., 2020, en el cual se evaluó el efecto del BuPB en la MIV de ovocitos porcinos, se reportó disminución en la proporción de ovocitos en MII y aumento en el número de ovocitos inmaduros, a concentraciones de 300, 400 y 500 μM de BuPB. Recientemente, un estudio in vivo realizado por Zhang et al., 2023 en ovocitos de ratón mostró de igual manera, que

el BuPB disminuyó la tasa de rompimiento de la vesícula germinal y la tasa de expulsión del cuerpo polar en todas las concentraciones empleadas en el estudio (15, 150 y 500 mg/kg de peso corporal). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el MePB tiene un efecto en la disminución de la MIV a concentraciones superiores a las empleadas con el BuPB, esto se atribuye al mayor potencial tóxico dado por la longitud de su cadena alquílica. Watanabe et al., 2013 reportaron que los PB que tenían una longitud moderada de cadena lateral de alquilo (C5 – C7) mostraron la mayor actividad estrogénica, lo que confirma que a mayor longitud de la cadena, como es el caso del BuPB, se requiere una concentración menor para encontrar efecto, en este caso, en la disminución de la MIV.

Uno de los posibles mecanismos de acción mediado por el MePB puede darse por su efecto a nivel mitocondrial, varias patologías y condiciones ambientales adversas alteran la función mitocondrial de múltiples maneras. Las mutaciones, deleciones o alteraciones de la replicación del ADNmt son la causa más común de disfunción mitocondrial, pero esta disfunción también puede resultar de la exposición a xenobióticos y condiciones ambientales adversas (Srinivasan et al., 2017). En particular, se ha propuesto que los PB inducen estrés oxidante mediante el aumento en la producción de ERO (Meng et al., 2020), alteración en la síntesis de enzimas antioxidantes (Jeong et al., 2020) y se sugirió también que el estrés oxidante inducido por el BuPB en las células del trofoblasto humano conduciría al colapso de la membrana mitocondrial. Las disfunciones mitocondriales van desde la reducción de la producción de ATP por fosforilación oxidativa, incapacidad para modular la producción excesiva de ERO y nitrógeno, la desregulación del calcio hasta la apertura del poro de transición de permeabilidad y el inicio de la apoptosis (Srinivasan et al., 2017).

En este estudio realizamos la técnica de evaluación de viabilidad en ovocitos con la tinción de MTT, que además de evaluar ovocitos vivos o muertos permite determinar la actividad mitocondrial. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a sales de

formazan, que se observa mediante la coloración azul/morada de las células, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas (De Castro, 2006). Esto se puede relacionar con el mecanismo de acción que ejerce el MePB en su efecto antimicrobiano donde se ha sugerido que actúa alterando el potencial eléctrico de membranas (celular y mitocondrial) y permeabilidad del agente microbiológico, bloqueando la generación de energía y propiciando la pérdida de su transporte, imposibilitando su crecimiento y propagación (Piqueres, 2019). Si bien la disminución de la viabilidad fue hasta un 70% en ovocitos es importante resaltar que las CC son las primeras en estar en contacto con el MePB, ejerciendo un papel protector hacia el ovocito.

Otros estudios han evaluado el efecto de los PB a nivel mitocondrial como es el caso de Jeong et al., 2020 donde evaluaron la exposición al BuPB durante la MIV sobre la distribución y función mitocondrial por medio de ovocitos teñidos con MitoTracker Deep Red, donde se observó que la exposición a 50 μM de BuPB causó una distribución anormal de las mitocondrias y alteraciones del potencial de membrana lo que los llevó a sugerir que la exposición a BuPB afectó negativamente la organización y función mitocondrial durante la maduración de los ovocitos. Adicional a este estudio Zhang et al., 2023 recientemente reportaron el efecto del BuPB en la reanudación meiótica y fertilización en ratones, encontrando que el BuPB perturba la integridad y la dinámica de las mitocondrias en los ovocitos de ratones, generando un aumento en la producción de ERO y apoptosis.

En este estudio también fue posible observar el daño en la cromatina de los ovocitos, donde se evidenció un porcentaje del 30% de ovocitos con daño a 1000 μM . Sabemos que el ADN eucariótico no está desnudo sino unido al ADN por histonas para formar nucleosomas y las colas (N-terminales) de las histonas se extienden fuera del nucleosoma, de modo que estos N-terminales se modifican fácilmente. Estas modificaciones pueden afectar la afinidad entre la histona y el ADN y cambiar el estado estructural de la cromatina, afectando así la expresión génica (Howard y Yehudit, 2009; Park et al., 2010; Meng et al., 2020). Esto se relaciona con lo descrito por Meng et al., 2020 que evaluaron los niveles de metilación de las

histonas en los ovocitos y reportaron que este aumentó significativamente tras la exposición de ovocitos a IBPB, lo que causa el aumento en la metilación en las histonas y estos sitios de metilación producen cambios en la estructura original del nucleosoma y la cromatina. Con esto se puede sugerir que, aunque el porcentaje de daño a la cromatina no es tan alto, el MePB podría estar generando daño en la cromatina de los ovocitos a través de la metilación de las histonas.

10.2 Viabilidad de las CC de los ovocitos porcinos

Las CC desempeñan un papel fundamental en la maduración adecuada de los ovocitos, en la adquisición de una mayor competencia de desarrollo (Fontana et al., 2023) y además los protegen de las ERO que se producen principalmente por procesos fisiológicos normales del metabolismo celular, debido a la baja capacidad del ovocito para movilizar moléculas antioxidantes (Martinez et al., 2023). En este estudio se encontró que la viabilidad de las CC en los COCs disminuyó hasta un 45% en la concentración de 750 μM (OV-CM), sin embargo, el ovocito seguía vivo. Hasta la concentración de 1000 μM en un 38% tanto los ovocitos como las CC estaban muertos. Lo anterior indica que las CC son más susceptibles al daño por el MePB ya que estas son las que inicialmente entran en contacto con el tóxico.

Diversos estudios se han enfocado a estudiar la producción de radicales libres e inducción de estrés oxidante donde se ha encontrado que los PB inducen altos niveles de ERO como lo descrito por Meng et al., 2020 donde demostraron que ovocitos porcinos expuestos a IBPB aumentaron la presencia de ERO causando apoptosis temprana en ovocitos y disminución en el proceso de MIV. En este estudio no se realizaron pruebas para evaluar la producción de ERO pero, debido a que, uno de los principales efectos del estrés oxidante a nivel celular es el daño al ADN, quisimos mediante el ensayo cometa evaluar el daño generado por el MePB en las CC como consecuencia de la alteración mitocondrial, el aumento en la producción de ERO y el estrés oxidante como posibles mecanismos de daño generado en el ADN. Como ya se mencionó anteriormente el efecto del MePB está alterando la función mitocondrial en las CC lo cual conduce a un estado de estrés oxidante que posteriormente podría desencadenar daño en el ADN.

10.3 Daño a la integridad del ADN de las CC

El ensayo de electroforesis en gel unicelular o ensayo cometa es uno de los ensayos más utilizados para detectar daño en el ADN a nivel de una sola célula. La determinación del daño se lleva a cabo mediante puntuación visual de las células después de clasificarlas en diferentes categorías según la longitud y la forma de la cauda. En este ensayo, la forma, el tamaño y la cantidad de ADN dentro del cometa desempeñan un papel importante en la determinación del nivel de daño (Kumaravel et al., 2009). Además, es posible evaluar la genotoxicidad que pueden causar algunos xenobióticos como los PB, en este caso, direccionado al efecto dañino en las CC que proveen soporte y confieren propiedades específicas al ovocito, para que termine su maduración citoplasmática y nuclear de manera adecuada y, posteriormente ocurra la ovulación y posterior fertilización.

Los resultados obtenidos muestran que el MePB causó daño genotóxico a las CC, donde a concentraciones de 750 y 1000 μM , las células empiezan a tener alteraciones que se pueden atribuir principalmente a la alta permeabilidad que parece poseer el MePB.

En un estudio realizado por Pérez et al., 2010 con técnicas de inmunodetección reveló que el PrPB indujo rupturas de doble cadena de ADN y daño oxidante en células Vero de riñón, sugiriendo que la base del efecto citostático observado en las células tratadas se debe a la acción del PrPB. Esto se relaciona con la técnica empleada en nuestro estudio para la determinación del tipo de daño al ADN en el cual, mediante el ensayo cometa que evalúa rupturas de cadena simple y doble del ADN, fue posible determinar que el MePB está generando daño. Las ERO se dirigen al ADN de las células y provocan modificaciones en las bases, rupturas de hebra simple o doble de las moléculas de ADN. El electrón único desapareado se une fácilmente a moléculas de ADN (grupo fosfato), lo que resulta en un emparejamiento y codificación de bases incorrectos en la replicación del ADN y la aparición de mutaciones genéticas (Liu et al., 2022). En este estudio se determinó que el tipo de daño al ADN fue causado por ruptura de cadenas simples y dobles. Al relacionar estos hallazgos con los resultados obtenidos en la cuantificación de la viabilidad de

las CC es posible sugerir que el tipo de daño al ADN que está siendo ocasionado por el MePB en su mayoría es irreversible, está llevando a las CC a la muerte posiblemente dada por apoptosis. En este estudio no medimos ningún factor que confirme un proceso de apoptosis en las células, pero en otros estudios ya se ha relacionado el efecto de los PB con el aumento en la producción de ERO, ruptura de doble cadena de ADN y presencia de factores apoptóticos como la Anexina V en ovocitos, sugiriendo que los PB a través de la disfunción mitocondrial, estrés oxidante y posterior daño al ADN desencadenan la muerte celular por apoptosis (Zhang et al., 2023).

Otra vía de generación de daño al ADN causado por los PB fue descrita por Meng et al., 2020 donde evaluaron la metilación de las histonas como alteración epigenética causada por la exposición a IBPB, encontrando que el nivel de metilación de las histonas aumentó significativamente, lo que sugiere que estos sitios de metilación cambian la estructura original del nucleosoma, afectando la expresión génica de los ovocitos, perjudicando su calidad y conduciendo a una disminución del proceso de maduración. Sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento este es el primer estudio que evalúa el daño al ADN en CC, los ya reportados se han realizado en ovocitos.

Cuantificar el daño al ADN de las CC permite dilucidar uno de los posibles mecanismos mediante el cual el MePB disminuye de manera sustancial la maduración de los ovocitos, ya que, al ser la primera barrera de protección hacia el ovocito, reciben el efecto directo del agente tóxico y alteran los procesos regulados por las CGM y las CC.

Los resultados obtenidos en este estudio y su relación con otros hallazgos reportados del MePB y otros PB a nivel celular nos permiten proponer un mecanismo de acción por el cual los PB están generando la disminución en la viabilidad de los ovocitos y CC, así como la disminución de la MIV, daño a la cromatina en ovocitos y el daño al ADN en las CC. Dichos mecanismos se encuentran descritos en la **Figura 17**.

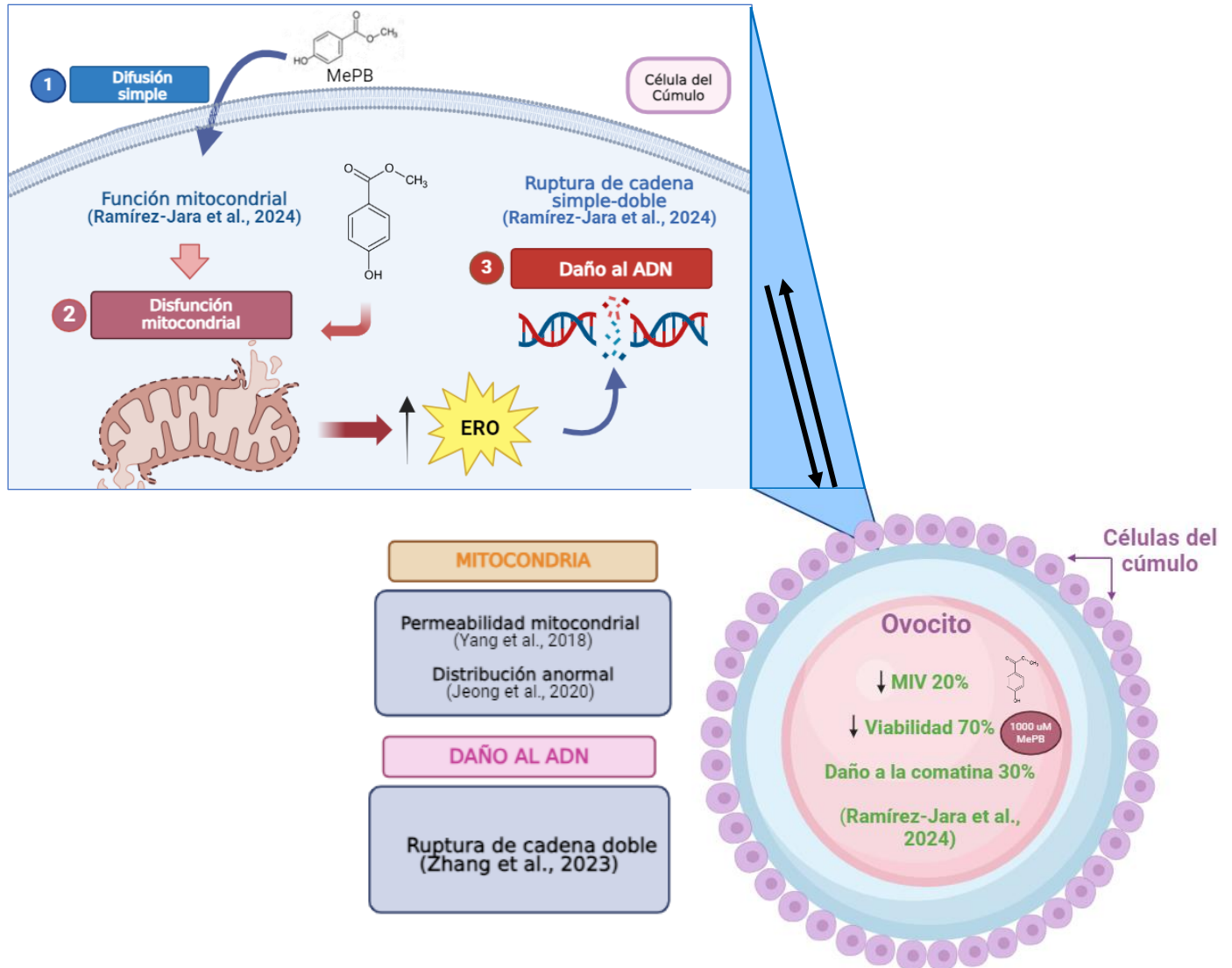


Figura 17. Diagrama esquemático que ilustra los mecanismos de acción ya reportados en otros estudios y en el presente trabajo (indicados en verde) sobre los efectos del MePB en ovocitos y CC.

En la **figura 17** se explica el mecanismo mediante el cual el MePB podría ejercer su efecto a nivel de los ovocitos y las CC. De manera inicial el MePB entra en contacto con las CC, por su estructura y tamaño tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática de la célula por difusión simple, ya al interior de la célula ejerce su acción de manera directa sobre la membrana mitocondrial, alterando su distribución normal y aumentando la permeabilidad, lo que conlleva a consecuencias a nivel de la función mitocondrial como lo es, el aumento en la

producción de ERO causado por la falla en la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Esta disfunción mitocondrial desencadena en la célula un proceso de estrés oxidante que genera en la célula daño en el ADN. Si la CC no logra reparar el daño causado se inicia el proceso de muerte celular mediado principalmente por apoptosis. La muerte de un gran porcentaje de CC que rodean el ovocito y se encargan de dar soporte e intervienen en procesos fundamentales como la reanudación meiótica afectan de manera directa la calidad del ovocito y su maduración. Por lo tanto, en el ovocito se observa un efecto colateral causado por la muerte de las CC además del efecto directo del MePB, disminuyendo su viabilidad, MIV y alterando la cromatina. *Los enunciados resaltados en verde corresponden a los hallazgos realizados en este estudio.

11. CONCLUSIONES

El MePB disminuyó la viabilidad de las CC y causó daño en su ADN, lo cual comprometió la viabilidad, MIV e integridad de la cromatina en los ovocitos. Lo anterior debido a la importancia de las CC en el proceso de reanudación meiótica, así como su función en el desarrollo adecuado del ovocito.

El MePB tuvo un mayor efecto citotóxico en las CC comparado con el ovocito. Lo anterior debido a que las CC protegen al ovocito y son las que de manera inicial entran en contacto con el PB.

Este es el primer estudio en demostrar los efectos del MePB en las CC y su repercusión en los ovocitos.

Estos hallazgos proporcionan información sobre la relación de los PB y su efecto en la disminución de la fertilidad femenina, para lo cual se requieren más estudios que profundicen en el daño que puede realizar el MePB.

12. PERSPECTIVAS

Se requieren más estudios de los efectos del MePB en ovocitos y CC para explicar de manera específica su mecanismo de acción y lograr determinar el impacto que podría causar en la fertilidad.

De vital importancia sería cuantificar el nivel de ERO que se están produciendo a nivel de ovocitos y CC, así como la cuantificación de superóxido dismutasa (SOD) en CC para poder afirmar la teoría propuesta en la cual sugerimos que el principal mecanismo de daño al ADN causado en las CC y los ovocitos se debe en gran parte al estrés oxidante que se produce en la célula bajo el efecto del tóxico. Para reforzar la teoría del daño oxidativo generado por las ERO sería pertinente evaluar la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, marcador del daño oxidativo en el ADN

Otro parámetro por evaluar es el porcentaje de apoptosis en las CC como un marcador de muerte celular inducido por ERO, estrés oxidante, daño al ADN y muerte celular. Ya que los niveles de apoptosis no han sido cuantificados en CC.

13. Bibliografía

- Abbara, A., Clarke, S., & Dhillon, W. (2018). Novel concepts for inducing final oocyte maturation in in vitro fertilization treatment. *Endocrine Reviews*, 1;39(5), 593-628.
- Alampanos, V., & Samanidou, V. (2021). An overview of sample preparation approaches prior to liquid chromatography methods for the determination of parabens in determination of parabens in biological matrices. *Microchemical Journal*, 164(4), 1-14.
- Albertini, D., Combelles, C., Benecchi, E., & Carabatsos, M. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 121(5), 647-653.
- Alexander, K., Laprade, B., Mauger, J., & Paruta, A. (1978). Thermodynamics of aqueous solutions of parabens. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(5), 624-627.
- Álvarez, C., Arellano, F., & Pérez, A. (2015). Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal. *Seneasa*, 21-37.
- Andreas, E., Winstanley, Y. E., & Robker, R. L. (2021). Effect of obesity on the ovarian follicular environment and developmental competence of the oocyte. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 18, 152-158.
- Barajas-Salinas, A., Ducolomb, Y., Betancourt, M., Núñez-Macías, E., López, A., Quezadas-Fuentes, J., . . . Casillas, F. (2020). Effects of methylparaben on in vitro maturation of porcine oocytes. *Applied Toxicology*, 41(2), 1-8.
- Basu, A. (2018). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1-13.
- Bereketoglu, C., & Pradhan, A. (2019). Comparative transcriptional analysis of methylparaben and propylparaben in zebrafish. *Science of the total Environment*, 671, 129-139.
- Berthelot-Ricou, A., Perrin, J., Di Giorgio, C., De Meo, M., Botta, A., & Courbiere, B. (2011). Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. *Fertility & Sterility*, 95, 1452-1457.
- Błędzka, D., Gromadzińska, J., & Wąsowicz, W. (2014). Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International*, 67, 27-42.
- Boberg, J., Axelstad, M., Svingen, T., Mandrup, K., Christiansen, S., Vinggaard, A., & Hass, U. (2016). Multiple Endocrine Disrupting Effects in Rats Perinatally Exposed to Butylparaben. *Toxicological Sciences*, 152(1), 244–256.

-
- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., & Hass, U. (2010). Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology*, *30*(2), 301-312.
- Brunet, S., & Maro, B. (2005). Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*, *130*(6), 801–811.
- Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., & Betancourt, M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in vitro*, *24*, 224-230.
- Chakarov, S., Petkova, R., Russev, G., & Zhelev, N. (2014). DNA damage and mutation. Types of DNA damage. *BioDiscovery*, *11*(1), 1-51.
- Chou, K. (2024). Endocrine system and endocrine disruptors. En P. Wexler, *Encyclopedia of Toxicology* (Vol. Fourth Edition, págs. 109-123). Academic Press.
- De Castro, C. (01 de 12 de 2006). *Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the MTT test*. Recuperado el 5 de Mayo de 2023, de https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf
- Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M., & Betancourt, M. (2009). In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biology and Toxicology*, *25*, 623-633.
- Esehly, W., Mourad, G., Mehanna, R., Kholief, M., El-Nikhely, N., Awaad, A., & Attia, M. (2022). The potential implications of estrogenic and antioxidant-dependent activities of high doses of methyl paraben on MCF7 breast cancer cells The potential implications of estrogenic and antioxidant-dependent activities of high doses of methyl paraben on MCF. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *36* (5).
- Fontana, L., Koch, J., Constantino, C., Mezzalira, A., Price, C., Marques, V., & Barreta, M. (2023). Expression profile of key genes involved in DNA repair mechanisms in bovine cumulus cells cultured with bovine serum albumin or fetal calf serum. *Reproductive Biology*, *23*(1), 1-9.
- Gal, A., Gedye, K., Craig, Z. R., & Ziv-Gal, A. (2019). Propylparaben inhibits mouse cultured antral follicle growth, alters steroidogenesis, and upregulates levels of cell-cycle and apoptosis regulators. *Reproductive Toxicology*, *89*, 100-106.

-
- Geer, L. A., Pycke, B., Waxenbaum, J., Sherer, D., Abulafia, O., & Halden, R. (2017). Association of birth outcomes with fetal exposure to parabens, triclosan and triclocarban in an immigrant population in Brooklyn, New York. *Journal Hazard Mater*, 323.
- Gosden, R., & Lee, B. (2010). Portrait of an oocyte: our obscure origin. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 973-983.
- Handa, O., Kokura, S., Adachi, S., Takagi, T., Naito, Y., Tanigawa, T., . . . Yoshikawa, T. (2006). Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology*, 227(1-2), 62 - 72.
- Heo, J., Kwon, D., Beirns, E., Tan, G.-Y. A., Lee, P.-H., & Kim, J. (2023). Superior methylparaben removal by anaerobic fluidized bed ceramic membrane bioreactor with PVDF tubular fluidized biocarrier: Reactor performance and microbial community. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(1), 1-11.
- Howard, C., & Yehudit, B. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, 10, 295–304.
- Hu, C., Bai, Y., Li, J., Sun, B., & Chen, L. (2023). Endocrine disruption and reproductive impairment of methylparaben in adult zebrafish. *Food and Chemical Toxicology*, 171, 1-8.
- Huang, Z., & Wells, D. (2010). The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Molecular Human Reproduction*, 16(10), 715–725.
- Jakopin, Ž. (2021). Assessment of the endocrine-disrupting potential of halogenated parabens: An in silico approach. *Chemosphere*, 264(1), 1-11.
- Jeong, P. S., Lee, S., Park, S. H., Kim, M. J., Kang, H. G., Nanjidsuren, T., & Kim, S. U. (2020). Butylparaben is toxic to porcine oocyte maturation and subsequent embryonic development following in vitro fertilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 1–13.
- Jones, K. (2004). Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod*, 10(1), 1-5.
- Jurewicz, J., Radwan, M., Wielgomas, B., Karwacka, A., Klimowska, A., Kałużny, P., . . . Hanke, W. (2020). Parameters of ovarian reserve in relation to urinary concentrations of parabens. *Environmental Health*, 19(1), 19-26.
- Kumaravel, T., Vilhar, B., & Faux, S. (2009). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53-64.

-
- Lemmens, B., & Lindqvist, A. (2019). DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *Journal of cell Biology*, 218(12), 3892–3902.
- Liu, X., Hussain, R., Mehmood, K., Tang, Z., Zhang, H., & Li, Y. (2022). Mitochondrial-Endoplasmic Reticulum Communication Mediated Oxidative Stress and Autophagy. *BioMed Research Internationa*, 2022, 1-12.
- López, A., Betancourt, M., Ducolomb, Y., Rodríguez, J. J., Casas, E., Bonilla, E., . . . Casillas, F. (2021). DNA damage in cumulus cells generated after the vitrification of in vitro matured porcine oocytes and its impact on fertilization and embryo development. *Porcine Health Management*, 7(1), 1-12.
- Luo, X., Chen, X., Lv, Y., Han, Y., Qu, X., Zhang, Y., . . . Jin, Y. (2022). MicroRNA-101 regulates oocyte maturation in vitro via targeting HAS2 in porcine cumulus cells. *Theriogenology*, 187, 119-126.
- Martin, L. (2008). DNA damage and repair: Relevance to mechanisms of neurodegeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(5), 377-387.
- Martinez, C. A., Rizos, D., Rodriguez-Martinez, H., & Funahashi, H. (2023). Oocyte-cumulus cells crosstalk: New comparative insights. *Theriogenology*, 205, 87-93.
- Maske, P., Dighe, V., & Vanage, G. (2018). N-butylparaben exposure during perinatal period impairs fertility of the F1 generation female rats. *Chemosphere*, 213, 114-123.
- Mena, M., Flores, L., Rodríguez, A., & Armendáriz, J. (2013). Mecanismos de reparación del ADN. En Salazar-Montes, Sandoval-Rodríguez, & Armendáriz-Borunda, *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw Hill. Recuperado el 13 de Octubre de 2023, de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743315>
- Meng, F., Jiao, X., Chen, F., Zhang, X., Duan, Z., Ding, Z., . . . Miao, Y. &. (2020). Isobutylparaben negatively affects porcine oocyte maturation through increasing oxidative stress and cytoskeletal abnormalities. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61(4), 433-444.
- Moos, R. K., Angerer, J., Dierkes, G., & Brüning, T. (2015). Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage. *Archives of Toxicology*, 90(11), 2699–2709.
- Nevoral, J. O., Petr, J., Dvoráková, M., Weingartová, I., Vyskocilová, A., Zámostná, K., . . . Jílek, F. (2014). Cumulus cell expansion, its role in oocyte biology

and perspectives of measurement: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica.*, 4, 212-225.

- Nishihama, Y., Yoshinaga, J., Iida, A., Konishi, S., Imai, H., Yoneyama, M., . . . Shiraishi, H. (2016). Association between paraben exposure and menstrual cycle in female university students in Japan. *Reproductive Toxicology*, 63, 107 - 113.
- Nowak, K., Jabłońska, E., Garley, M., Radziwon, P., & Ratajczak-Wrona, W. (2021). Methylparaben-induced regulation of estrogenic signaling in human neutrophils. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 538, 1-8.
- Nowak, K., W. W., Górska, M., & Jabłońska, E. (2018). Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 474, 238 - 251.
- Pailas, A., Niaka, K., Zorzompokou, C., & Marangos, P. (2022). The DNA Damage Response in Fully Grown Mammalian Oocytes. *Cells*, 11(5):798, 1-16.
- Pan, B., & Li, J. (2019). The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(8), 1-12.
- Park, K., Johnson, C., & Magnani, L. (2010). Global H3K9 dimethylation status is not affected by transcription, translation, or DNA replication. *Molecular Reproduction & Development*, 77, 420–429.
- Park, N.-Y., Cho, Y. H., Choi, K., Lee, E.-H., Kim, Y. J., Kim, J. H., & Kho, Y. (2019). Parabens in breast milk and possible sources of exposure among lactating women in Korea. *Environmental pollution*, 255, 113-142.
- Pérez, J. M., Peropadre, A., Herrero, Ó., Fernández, P., Labrador, V., & Hazen, M. J. (2010). Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells. *Mutation Research*, 702(1), 86-91.
- Piqueres, M. (2019). Actividad antimicrobiana de compuestos de origen natural y su aplicación en la industria cosmética. *Memoria de Trabajo Fin de Grado - Universitas Miguel Hernandez*. Elche, España.
- Reader, K., Stanton, J., & Juengel, J. (2017). The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. *Biology (Basel)*, 6(3), 1-22.
- Russell, D. L., Gilchrist, R. B., Brown, H. M., & Thompson, J. G. (2016). Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? *Theriogenology*, 86(1), 62-68.
- Sabalitschka, T. (1930). Application of ethyl p-hydroxybenzoate in maintenance of sterility, in sterilization and in disinfection. *Archives of Pharmacy*, 268, 653–673.

-
- Sen, A., & Caiazza, F. (2013). Oocyte maturation: a story of arrest and release. *Frontiers in Bioscience-scholar*, 5 (2), 451-477.
- Smith, K. W., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P. L., Calafat, A. M., & Hauser, R. (2013). Urinary Paraben Concentrations and Ovarian Aging among Women from a Fertility Center. *Environmental Health Perspectives*, 121(11-12), 1299-1305.
- Soni, M., Carabin, I., & Burdock, G. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, 43(7), 985-1015.
- Srinivasan, S., Guha, M., Kashina, A., & Avadhani, N. (2017). Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *BioMed Research International*, 1858(8), Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection.
- Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2019). Chapter 8 - Ovarian Life Cycle. En J. F. Strauss, & R. L. Barbieri, *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)* (págs. 167-205). Boston: Elsevier.
- Tanghe, S., Soom, A., Nauwynck, H., Marc, C., & Kruif, D. (2002). A Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilisation. *Molecular Reproduction*, 61(3), 414-424.
- Valbuena, D. S., Meléndez-Flórez, M. P., Villegas, V. E., Sánchez, M. C., & Rondón-Lagos, M. (2020). Cellular and genetic damage as determinants of pesticide toxicity. *Ciencia en Desarrollo*, 11, 11(2), 25-42.
- Vale, F., Sousa, C. A., Sousa, H., Santos, L., & Simões, M. (2022). Parabens as emerging contaminants: Environmental persistence, current practices and treatment processes. *Journal of Cleaner Production*, 347, 1-18.
- Valle-Sistac, J., Molins-Delgado, D., Díaz, M., Ibáñez, L., Barceló, D., & Díaz-Cruz, M. (2016). Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4. 88, 243-249.
- Watanabe, Y., Kojima, H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Ohta, S., & Kitamura, S. (2013). Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor α and β and androgen receptor. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 227-234.
- Wei, F., Mortimer, M., Cheng, H., Sang, N., & Guo, L.-H. (2021). Parabens as chemicals of emerging concern in the environment and humans: A review. *Science of The Total Environment*, 778, 1-17.

-
- Yan, W., Li, M., Guo, Q., Li, X., Zhou, S., Tang, W., . . . Wang, S. (2022). Chronic exposure to propylparaben at the humanly relevant dose triggers ovarian aging in adult mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 1-10.
- Yousefzadeh, M., Henpita, C., Vyas, R., Soto, C., Robbins, P., & Niedernhofer, L. (2021). Daño en el ADN: ¿cómo y por qué envejecemos? *eLife*, 10, 1-17.
- Zhang, Y., Sun, L., Zhang, D., Gao, Y., Ma, H., Xue, Y., & Zhang, M. (2023). Butylparaben weakens female fertility via causing oocyte meiotic arrest and fertilization failure in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 266, 1-11.
- Ziv-Gal, A., Berg, M. D., & Dean, M. (2021). Paraben exposure alters cell cycle progression and survival of spontaneously immortalized secretory murine oviductal epithelial (MOE) cells. *Reproductive Toxicology*, 100, 7-16.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00122

Matrícula: 2213800798

EFFECTO DEL METILPARABENO EN LA INTEGRIDAD DEL ADN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO DE OVOCITOS PORCINOS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 14 del mes de marzo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
- DRA. EDITH ARENAS RIOS
- DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO
- DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

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

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: YENNY PAOLA RAMÍREZ JARA

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

APROBAR

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



YENNY PAOLA RAMÍREZ JARA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO

SECRETARIO

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ