

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

T E S I S

“EFECTOS DEL PROPILPARABENO EN EMBRIONES PORCINOS
PRODUCIDOS *IN VITRO*”

Para obtener el grado de
Maestra en Biología de la Reproducción Animal

P R E S E N T A

Biól. Exp. Jessica Elivier Núñez Macías
Matrícula:2212801424
elivier12@hotmail.com

DIRECTOR

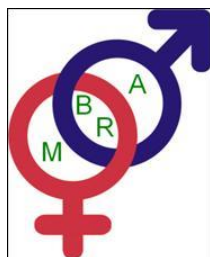
Dr. José Miguel Betancourt Rule

ASESORES

Dra. Alma Guadalupe López López
Dr. Eduardo Casas Hernández

JURADO

Presidente: Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos
Secretario: Dr. Eduardo Casas Hernández
Vocal: Dra. Alma Guadalupe López López
Vocal: Dr. Juan José Rodríguez Mercado



Iztapalapa, Ciudad de México 12 de marzo de 2024

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

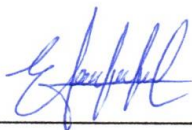
Ciudad de México, a 12 de marzo de 2024.

Comisión Académica del Posgrado

Presente

El (La) que suscribe Jessica Elivier Núñez Macías alumno(a) con número de matrícula 2212801424, del posgrado Maestría 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 "Efectos del propilparabeno en embriones porcinos producidos in vitro" a desarrollar en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I). 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.



Jessica Elivier Núñez Macías

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

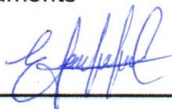
La que suscribe Jessica Elivier Núñez Macías alumna de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada "Efectos del propilparabeno en embriones porcinos producidos in vitro".

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. jurado para la obtención del grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original creación, producto de 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 12 de marzo de 2024.

Atentamente



Jessica Elivier Núñez Macías

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR:

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Profesor Titular "C", Tiempo completo

Investigador Nacional Emérito, SNI

Laboratorio de Biología Celular

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

UAM-Iztapalapa

Correo: bet@xanum.uam.mx

ASESORES:

Dra. Alma Guadalupe López López

Profesora Asociada "D", Tiempo completo

Laboratorio de Biología Celular

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

UAM-Iztapalapa

Correo: alma.lopez@xanum.uam.mx

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor Titular "C", Tiempo completo

Laboratorio de Biología Celular

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

UAM-Iztapalapa

Correo: dino@xanum.uam.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Profesor Titular "A", Tiempo completo

Investigador Nacional Nivel I, SNI

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

UAM-Iztapalapa

Correo: fahiel.ca@xanum.uam.mx

Dra. Alma Guadalupe López López

Profesora Asociada "D", Tiempo completo

Laboratorio de Biología Celular

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

UAM-Iztapalapa

Correo: alma.lopez@xanum.uam.mx

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor Titular "C", Tiempo completo

Laboratorio de Biología Celular

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

UAM-Iztapalapa

Correo: dino@xanum.uam.mx

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

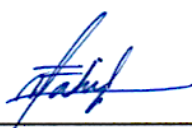
Profesor de Carrera Asociado "C", Tiempo completo

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

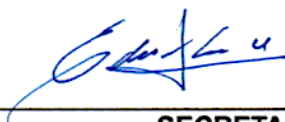
MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Los miembros del jurado de examen designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Efectos del propilparabeno en embriones porcinos producidos in vitro" el día 12 de marzo del 2024.



PRESIDENTE

Dra. Miriam Fahiel Casillas Ávalos
Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM-Iztapalapa



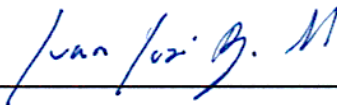
SECRETARIO

Dr. Eduardo Casas Hernández
Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM-Iztapalapa



VOCAL

Dra. Alma Guadalupe López López
Departamento de Ciencias de la Salud. 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 CONACHyT para estudios de posgrado. Número de apoyo: 802122, otorgado por el CONACHyT a Jessica Elivier Núñez Macias con CVU: 1142611

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 CONACHyT (PNPC) Registro 003797.

DEDICATORIA

A mi madre, no hay palabras suficientes para expresar todo el amor y gratitud que siento por ti, eres mi mayor inspiración y apoyo a lo largo de toda mi vida, gracias por enseñarme a no rendirme nunca, ni dejar mis sueños a un lado, a ser valiente y perseverante. Nunca podré agradecerte tantas cosas que has hecho por mi, y que me has enseñado para ser siempre mejor persona.

A mi padre, quiero darte gracias por ser un héroe en mi vida y mi mayor ejemplo a seguir, gracias por tu amor incondicional, me has enseñado a ser fuerte y luchar por lo que quiero, ese carácter tan característico que tengo te lo debo a ti, también gracias por todo tu esfuerzo en trabajar todos los días para que no me faltara nada, estoy verdaderamente agradecida por tenerte en mi vida.

A Charito por ser la mejor compañera de vida que dios me pudo regalar, no puedo expresar la suerte que tengo de tenerte como hermana, sé que siempre puedo contar contigo y quiero decirte que si un día nuestros caminos se separan, será solo la distancia, porque nuestra alma siempre estará unida bajo cualquier circunstancia. Gracias por ser mi mejor amiga y cómplice de aventuras, te amo con el alma.

A Uriel, gracias por compartir un pedacito de tu vida conmigo, por hacerme reír, por tu compañía incondicional, por las pláticas nocturnas, por siempre escucharme y ser mi apoyo en todo momento, gracias por confiar en mi y amarme por sobre todas las cosas, doy gracias a dios por cruzarte en mi camino.

A mis abuelitos por enseñarme tantas cosas de la vida, por ser mis segundos padres y cómplices de mis locuras, estoy muy agradecida con dios que me dio la oportunidad de tenerlos y amarlos cada día.

A mi mamá Eliza y Erika por cuidarme y preocuparse por mi desde que tengo memoria, como mis segundas madres, por sus consejos y sus regaños, por estar para mi en cualquier circunstancia, las quiero mucho.

A mis primos, Noehmi, Santiago, Moy, Arturo, Magali, Jesús, Ivonne, Michel, Brenda, gracias por tantos años de convivencia juntos, por las risas, las travesuras, los logros, por ser mis hermanos a quienes amo muchísimo. A Uriel no se si me escuchas desde el cielo, pero quiero decirte que te extrañare toda la vida y aunque todo haya cambiado, siempre te tendré presente, si dios quiere nos volveremos a ver, te quiero mucho.

A Boster y Madonna por ser mis fieles acompañantes y la alegría de mis días.

AGRADECIMIENTOS

A dios por poner personas tan lindas en mi camino y guiar siempre mis pasos.

A la Dra. Miriam Fahiel Casillas Ávalos, gracias por darme la mejor clase que tuve en la licenciatura, por ser tan apasionada en lo que hace y lograr transmitirlo, por ser una excelente profesora, de ahí nació el sueño de ver embriones con mis propios ojos, por estar presente en cada logro, por celebrar conmigo nuestros primeros embriones. Gracias por aceptarme y llevarme al mejor laboratorio de UAM-i, donde no solo logré mi sueño, encontré una familia.

Al Dr. José Miguel Betancourt Rule, por siempre brindarme su apoyo incondicional, por compartirme sus historias, su sabiduría, por los buenos consejos y por decirme tantas veces que no me estrese, que todo saldrá bien, por confiar en mi, por guiarme y acompañarme por tantos años, por ser mi ejemplo a seguir en mi vida profesional y sobretodo por su valiosa amistad.

A la Dra. Alma Guadalupe López por enseñarme que nunca hay que desistir, que a veces las cosas no salen y es parte del proceso y que llorar también se vale, más cuando nos dedicamos a la ciencia, por estar presente en todo momento, recordaré mucho cuando vimos los primeros embriones y los gritos de felicidad y sobretodo por convertirse en una gran amiga.

A la Dra. Zayil Salazar por su apoyo en el transporte de la muestra de semen, por contarme sus anécdotas de la vida en lo que esperábamos concluyera la larga jornada en el laboratorio. Por explicarme tantas cosas que no entendía bien, por sus charlas tan amenas y por ser tan linda persona.

Al Dr. Eduardo Casas Hernández, por su apoyo y paciencia en todo momento, gracias por compartir sus experiencias, sus consejos, sus bromas y por la pasión que siente por la ciencia que siempre contagia.

A MVZ. Trinidad Sierra Guzmán, por ayudarme en el trabajo más pesado, durante la colecta de ovarios.

A mis compañeros y amigos de laboratorio en especial a Adyeni Barajas quien fue mi primer equipo de trabajo, gracias amiga por las pláticas tan amenas, las carcajadas, las metidas de pata y tu compañía durante los experimentos. A Brenda, Sinaí, Mau, Fer, Pao, por hacer del trabajo algo divertido, por su compañía en todo momento.

A mi mejor amigo Jaime Barraza, quien siempre esta en las buenas y en las peores, haciéndome reír con sus boberías, gracias por estar conmigo desde siempre, por los regaños cuando la estoy regando y por celebrar los logros juntos, siempre estaré para ti.

A mi amix, Bruno Hernández por que aunque estemos separados siempre serás mi persona, en quien confío y sé que contaremos mutuamente siempre.

A Yenny Ramírez, quien sin querer me demostró que el título de mejor amiga no es por la cantidad de años que lleven de conocerse sino por la calidad y lealtad de la persona, gracias por ser tan linda conmigo y por compartir ratos tan agradables, los amigos son la familia que uno elige.

Al rastro “los arcos”, por brindar las muestras biológicas para la realización de este proyecto.

Al CONACHyT, por el otorgamiento de la beca para realizar mis estudios de maestría.

A mi alma mater, la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por darme tanto desde que ingrese a la licenciatura y brindarme las herramientas para concluir mi estudio de posgrado.

*“Nunca olvidaré el día en que me incline al microscopio y vi algo divertido en los cultivos.
Lo que vi al inclinarme fue un blastocisto mirándome desde abajo. En ese momento pensé:
Lo logramos”*

Robert Edwards

RESUMEN

Introducción: Los parabenos (PBs) son ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, clasificados según la cadena alquílica, de los cuales el MePB y el PrPB son los de uso más frecuente, además en forma conjunta. Todos los miembros de esta clase de compuestos comparten un anillo de benceno, un grupo hidroxilo y un grupo éster. Los PBs son ampliamente utilizados como antibacterianos y fungicidas en alimentos y productos de cuidado personal como pastas dentales, productos capilares, desodorantes, cremas y lociones. Su uso indiscriminado ha permitido que sean detectados en diferentes ecosistemas, por lo que tanto humanos como otros organismos se encuentran altamente expuestos. Un aspecto importante de los PBs es que se han catalogado como disruptores endocrinos, los cuales pueden alterar el equilibrio normal de los sistemas endocrinos, ya que se unen a los receptores de estrógeno debido a que son estructuralmente similares provocando desordenes hormonales y problemas de fertilidad.

Además, cuando la exposición a productos de cuidado personal que contienen PBs se aplica frecuentemente sobre la piel, estos, se acumulan en los tejidos subyacentes como en el tejido mamario mostrando funciones antagonistas al receptor de estradiol, lo que confirma las fuertes actividades de unión de los PBs a receptores, así como su papel en la carcinogénesis de mama humano. El conocimiento de los efectos del PrPB es importante ya que se sabe poco de la parte reproductiva. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del PrPB, en concentraciones de 0, 25, 50, 100, 150 y 300 μM durante el proceso del DE *in vitro* en el modelo porcino.

Resultados: Se hicieron cinco ensayos con 50 ovocitos por pozo. Después de 144 h de DE se determinó el número total de embriones desde etapa de dos blastómeros hasta blastocisto tardío. En el grupo control se obtuvo la mayor cantidad de embriones en estado de blastocisto, estos se apreciaron de buena calidad, mientras que a medida que aumento la concentración de PrPB hubo un descenso de forma concentración-dependiente en el DE al igual que en la viabilidad la cual presentó

diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de 100, 150 y 300 μM . De acuerdo con lo observado a esas concentraciones se encontraron embriones con daños en el número de blastómeros, zona pelúcida, fragmentación de cromatina y blastómeros anucleados. La estimación de la concentración letal₅₀ fue de 145 μM .

Conclusión: La exposición del PrPB durante el DE *in vitro* en el modelo porcino produjo alteraciones en los embriones, provocando un descenso en la viabilidad en correlación con el aumento en la concentración, los embriones que estuvieron expuestos a altas concentraciones de PrPB (100 y 150 μM) mostraron un retraso o suspensión del desarrollo temprano y aquellos que se vieron más afectados (300 μM) no lograron contrarrestar el daño para continuar con el desarrollo por lo que se infiere que se programaron a apoptosis.

ABSTRACT

Introduction: Parabens (PBs) are esters of p-hydroxybenzoic acid, classified according to the alkyl chain, of these MePB and PrPB are the most frequently used, along or mixed. All members of this kind of compounds share a benzene ring, a hydroxyl group, and an ester group. PBs are widely used as antibacterials and fungicides in foods and personal care products such as toothpastes, hair products, deodorants, creams and lotions. Their indiscriminate use has allowed them to be detected in different ecosystems, so both humans and other organisms are highly exposed. An important aspect of PBs is that they have been classified as endocrine disruptors, which can alter the normal balance of the endocrine systems, since they bind to cells estrogen receptors because they are structurally similar, causing hormonal disorders and fertility problems.

Furthermore, when exposure to personal care products containing PBs is frequently applied to the skin, they accumulate in underlying tissues such as breast tissue, showing antagonistic functions to the estradiol receptor, confirming the strong binding activities of the PBs. PBs receptors as well as their role in human breast carcinogenesis. Knowledge of the effects of PrPB is important since little is known about the reproductive system. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of PrPB, at concentrations of 0, 25, 50, 100, 150 and 300 μM during the *in vitro* embryo development process in the porcine model.

Results: Five trials were done with 50 oocytes per well. After 144 h of embryo development, the total number of embryos from the two blastomere stage to the late blastocyst was determined. In the control group, the greatest number of embryos were obtained in the blastocyst stage, these shown of good quality, while as the concentration of PrPB increased, there was a concentration-dependent decrease in the embryo development as well as in viability. Which had a statistically significant difference in the concentrations of 100, 150 and 300 μM . At these concentrations, embryos shown damage in the number of blastomeres, zona pellucida, appearance

chromatin fragmentation and enucleated blastomeres. The estimate of the LC₅₀ was 145 µM.

Conclusion: The exposure of PrPB during in vitro embryo development in the porcine model, shown viability decrease in correlation with the increase in concentration, embryos that were exposed to high concentrations of PrPB (100 and 150 µM) showed a delay or suspension of early development and those who were most affected (300 µM) were unable to counteract the damage to continue development, so it is inferred that they were programmed for apoptosis.

ABREVIATURAS

PBs= parabenos

PrPB= propilparabeno

CL₅₀= concentración letal 50

CIM₅₀= concentración de la inhibición de la maduración 50

COCs= complejos ovocito-células del cúmulo

MIV= maduración *in vitro*

FIV= fertilización *in vitro*

DE= desarrollo embrionario

EROS= especies reactivas de oxígeno

FSH= hormona folículo estimulante

LH= hormona luteinizante

E2= estradiol

VG= vesícula geminal

MI= metafase I

MII= metafase II

ADN= Ácido desoxirribonucleico

ARNm= Ácido ribonucleico mensajero

AMPc= Adenosín monofosfato cíclico

PKA= proteincinasa A

FPM= factor promotor de la maduración

EGF= factor de crecimiento epidérmico

TRA= tecnologías de reproducción asistida

GSH= glutatión

TBMm= Tris modificado

NCSU-23= North Carolina State University-23

BSA= albúmina sérica bovina

MTT= bromuro de tetrazolio

Hoechst= bisbenzimidaz

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Reproducción en mamíferos.....	1
1.1.1 Gametogénesis	1
1.1.2 Ovogénesis y foliculogénesis	2
1.1.3 Maduración del ovocito.....	5
1.1.4 Arresto meiótico	7
1.1.5 Mecanismo de arresto meiótico del ovocito.....	7
1.1.6 Mecanismo de reanudación meiótica del ovocito	9
1.1.7 Reproducción asistida	10
1.1.8 Fertilización <i>in vitro</i>	10
1.1.9 Desarrollo embrionario	11
1.1.10 Calidad embrionaria	13
1.2 Toxicología Reproductiva	15
1.2.1 Parabenos.....	15
1.2.2 Propilparabeno.....	18
1.3 Importancia del modelo porcino	19
2. Antecedentes.....	19
2.1 Parabenos en la reproducción	19
2.2 Parabenos en el desarrollo embrionario	22
3. Justificación	23
4. Pregunta de investigación.....	23
5. Hipótesis	24
6. Objetivo general.....	24
6.1 Objetivos particulares.....	24
7. Diseño de investigación.....	24
8. Metodología	26
8.1 Obtención de ovarios, punción folicular y colecta de COCs.....	26
8.2 Maduración <i>in vitro</i>	26
8.3 Fertilización <i>in vitro</i>	27
8.4 Preparación de la muestra de semen	27
8.5 Tratamiento con PrPB.....	28
8.6 Criterios de evaluación de viabilidad	29
8.7 Criterios de evaluación de la MIV	30
8.8 Análisis estadístico.....	30
9. Resultados	31
9.1 Efectos del PrPB en la viabilidad durante la maduración <i>in vitro</i>	31

9.2 Efecto del PrPB en la MIV de ovocitos	33
9.3 Efectos del PrPB en el desarrollo embrionario	35
10. <i>Discusión</i>	48
10.1 Alteraciones en la viabilidad y MIV	49
10.2 Viabilidad y DE.....	51
11. <i>Conclusión</i>.....	57
12. <i>Perspectivas</i>	58
13. <i>Bibliografía</i>.....	59
14. <i>Anexos</i>.....	66

1.Introducción

1.1 Reproducción en mamíferos

La reproducción es una característica esencial de los seres vivos, que a lo largo del tiempo les ha permitido perpetuar las características de sus progenitores, que les brindan la capacidad de adaptarse y responder a los cambios ambientales (Carlson, 2019).

1.1.1 Gametogénesis

La reproducción inicia con la formación de los gametos durante el desarrollo embrionario (DE), con la gametogénesis que es el proceso mediante el cual se desarrollan los gametos masculinos (espermatozoides) y femeninos (ovocitos), al concluir este proceso los gametos serán genotípicamente y fenotípicamente maduros y capaces de participar en el proceso de fertilización (Arteaga y García, 2017). La maduración de los gametos masculinos ocurre a través de la espermatogénesis, que se inicia desde la pubertad con la maduración de espermatogonias; cada una de ellas originan cuatro células hijas, para así formar millones de espermatozoides. En cambio, la ovogénesis (maduración de los gametos femeninos) se inicia desde el periodo fetal y después de permanecer latente durante la infancia, al llegar a la pubertad se reinicia para formar una célula madura (ovocito) en cada ciclo sexual (Serna, 2012).

La gametogénesis se divide en cuatro fases i) el origen extraembrionario de las células germinales y su migración a las gónadas, ii) el aumento del número de las células germinales mediante mitosis, iii) la reducción del número cromosómico mediante meiosis y iv) la maduración estructural y funcional de los ovocitos y los espermatozoides (Carlson, 2019).

En el ser humano las células germinales primordiales migran desde el saco vitelino a través del alantoides, el intestino caudal y su mesenterio dorsal; al llegar a la cresta

gonadal durante la sexta semana de embarazo en donde se diferencian a células madre espermatogonias en el varón y ovogonias en la mujer (Arteaga y García, 2017) en el caso de la mujer, todos los ovocitos han iniciado la profase I de la meiosis I, pero estos están detenidos en la fase de diploteno manteniéndose en estado de arresto hasta después de la pubertad. Hasta este momento hay aproximadamente de entre 600 000 y 800 000 ovocitos inmaduros, durante la infancia la mayoría se vuelven atrésicos, llegando a la pubertad unos 40 000, de los cuales sólo 400 y 500 llegarán a la ovulación durante la menstruación uno por mes hasta el final de la fertilidad (Sadler y Langman, 2012).

1.1.2 Ovogénesis y foliculogénesis

La ovogénesis y la foliculogénesis son dos procesos que ocurren simultáneamente dentro del folículo ovárico, y que son esenciales para la producción de un ovocito maduro (Figura 1) (Sadler y Langman, 2012).

La ovogénesis ocurre en los ovarios y se inicia en el período embrionario cuando a partir de las ovogonias se forman los ovocitos primarios, los cuales en este período entran en la meiosis I y se detienen en la etapa de diploteno, de la profase permaneciendo así hasta el período posnatal. A partir de la pubertad (12–15 años en las mujeres), en períodos cíclicos de aproximadamente 28–30 días, un grupo de ovocitos primarios reanudarán la meiosis I, la terminarán y entrarán en la meiosis II, transformándose así en un ovocito secundario (Arteaga y García, 2017).

En los mamíferos durante la foliculogénesis, el ovocito primario madura, modificando su estructura y almacenando moléculas sintetizadas por él o ingresadas desde las células foliculares. La zona pelúcida aumenta de tamaño y de grosor. La síntesis de ARNm queda finalmente bloqueada; por lo que, el ovocito debe tener previamente almacenada la información en el ARNm necesaria para completar la meiosis y llevar a cabo la fecundación y las primeras etapas de la

embriogénesis. Uno o dos días antes de la ovulación, la hormona luteinizante (LH) en el caso de las mujeres, y estradiol (E2) en las cerdas, desencadena la reactivación de la meiosis en el ovocito madurado durante la foliculogénesis. Así el ovocito primario evoluciona a secundario y este inicia la meiosis II, pero este queda detenido en metafase II, dando como resultado un ovocito maduro apto para la fecundación. Solo al ser fecundado por el espermatozoide, concluye la meiosis II y se transforma en el óvulo (Morales, 2020).

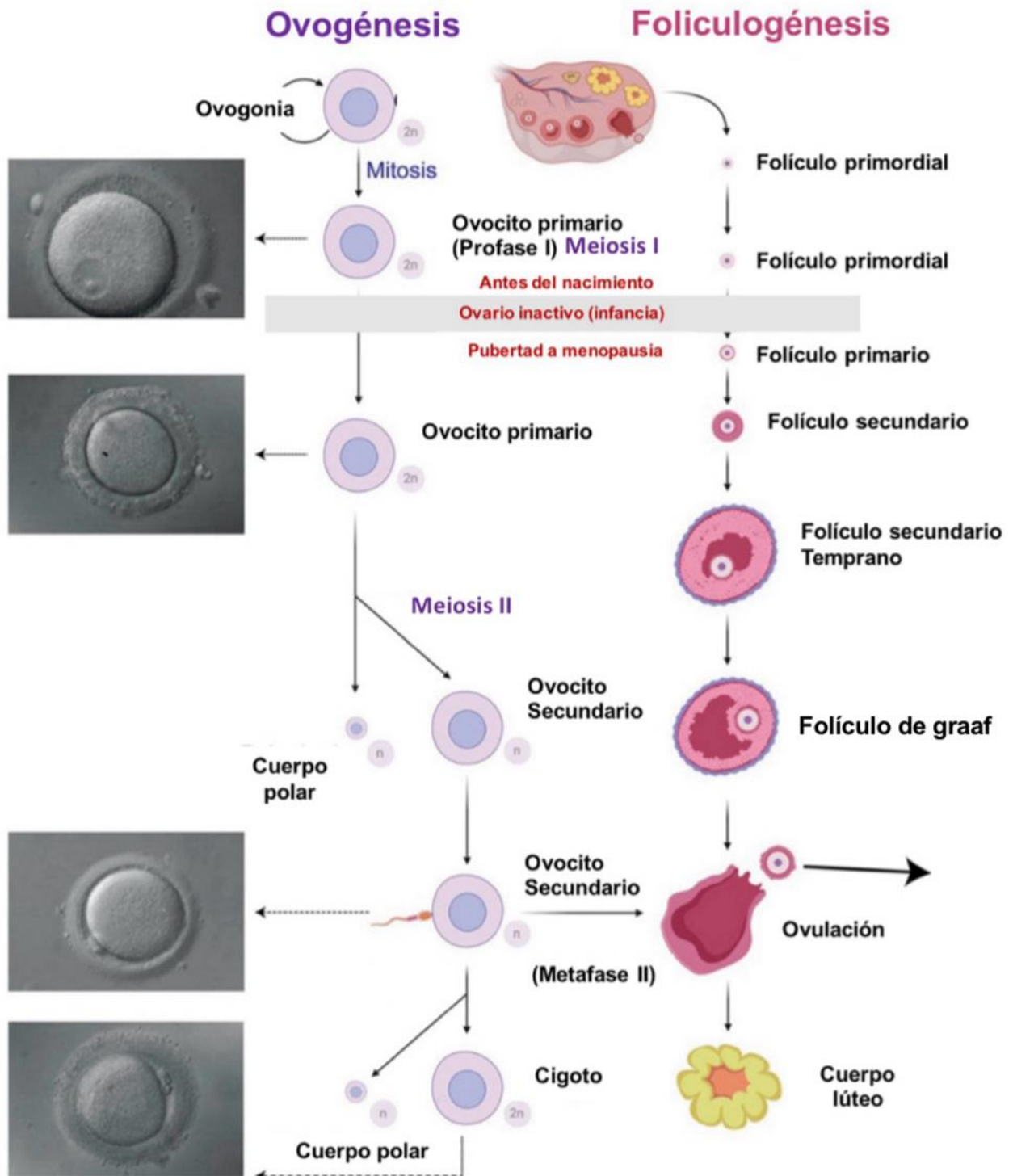


Figura 1. Etapas de la foliculogénesis y ovogénesis modificado de Siu, 2021.

En la mayoría de los mamíferos domésticos el desarrollo de las ovogonias y ovocitos se lleva a cabo durante la primera mitad de la gestación. En la cerda, la ovogénesis se extiende hasta las primeras semanas después del nacimiento (24 a 25 días posteriores). Además, la transformación de ovogonias en ovocitos es más lenta en cerdas que en otras especies (Casillas, 2014).

1.1.3 Maduración del ovocito

La maduración del ovocito consta de dos procesos: la maduración meiótica o nuclear y la citoplasmática. La primera se refiere al avance del ovocito desde el estado de diploteno de la primera profase (primer arresto meiótico) hasta la metafase II de la segunda división meiótica (segundo arresto meiótico). El reinicio de la meiosis se presenta después del aumento preovulatorio de la LH, al promover el progreso del ovocito a la metafase II. Esta etapa se caracteriza por el rompimiento de la vesícula germinal (Profase I) y la expulsión del primer cuerpo polar. El evento que es necesario para la reanudación de la meiosis es la expansión de las células del cúmulo, la cual es causada por la producción de ácido hialurónico procedente de estas células en respuesta al aumento de gonadotropinas (Ducolomb, *et al.*, 2012).

La maduración citoplasmática, se adquiere después que el ovocito es meióticamente competente (Casillas, 2014), es un proceso que implica una serie de sucesos no relacionados directamente con el progreso de la meiosis, pero que preparan al ovocito para su fertilización y DE subsecuente.

En este proceso, entre otros se produce una redistribución de las mitocondrias a una posición perinuclear y redistribución de los gránulos corticales hacia la periferia, que es necesaria para el progreso de la maduración (Teteltitla, 2014).

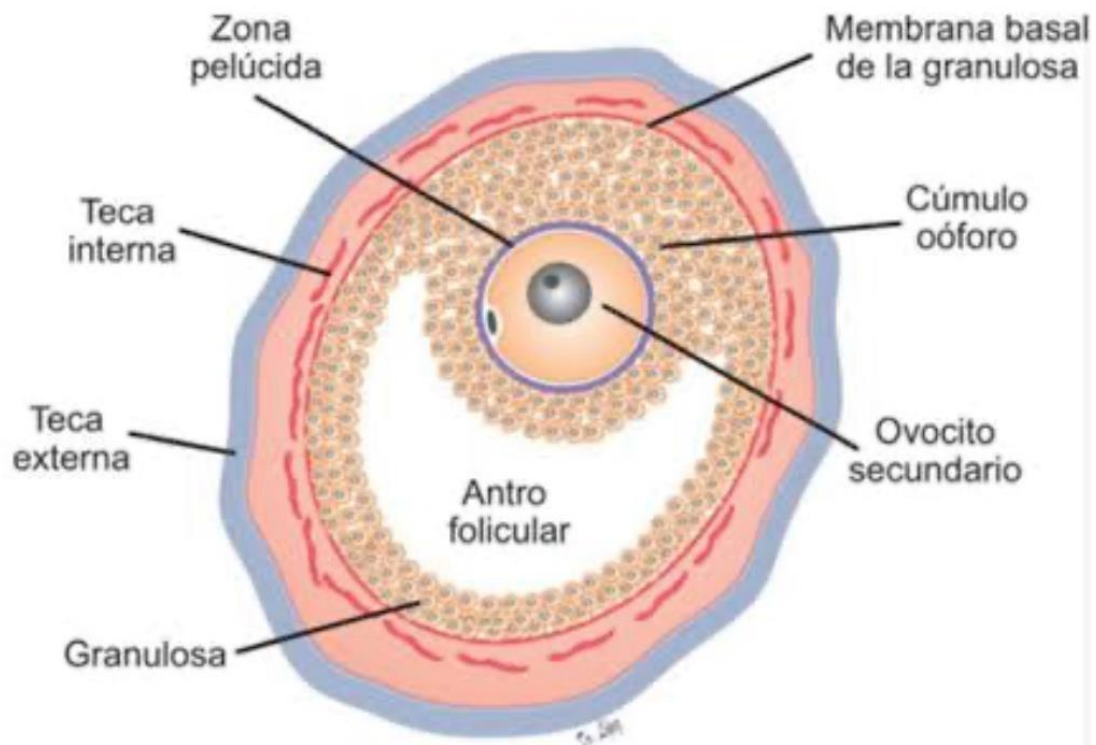


Figura 2. Esquema representativo de los componentes de un folículo maduro, en su interior se observa un ovocito secundario rodeado por la zona pelúcida y su primer cuerpo polar. Tomado de López-Serna, 2011.

1.1.4 Arresto meiótico

Las células del cúmulo que rodean al ovocito son las responsables de arresto meiótico a través de la producción y liberación de moléculas como el AMPc o purinas como adenina e hipoxantina. Estas señales de inhibición de las células foliculares pueden transmitirse al ovocito, a través de las uniones comunicantes entre las células de la corona radiada y el ovocito que atraviesan la zona pelúcida (Turathum, 2021).

Los niveles elevados de AMPc, suministrado por las células foliculares, mantienen la detención del ovocito en profase I y sólo es liberado del efecto inhibitorio cuando se interrumpe la comunicación a través de las uniones comunicantes por lo que los niveles de AMPc descienden. Esta disminución va a inactivar a la proteincinasa dependiente de AMPc (PKA) y a través de una cascada de señalización, se activa una fosfatasa que desfosforila al factor promotor de la maduración (FPM) (Casillas, 2014).

1.1.5 Mecanismo de arresto meiótico del ovocito

El incremento de AMPc en las células de la granulosa murales y de la teca debido a la hormona folículo estimulante (FSH) aumenta la permeabilidad de las uniones comunicantes para el paso del AMPc, la fosfodiesterasa está inhibida y no degrada al AMPc. Así las proteínas CDC25 y Weel/Myt1 mantienen inactivo al FPM, dicha inactivación resulta en el crecimiento del ovocito y arresto meiótico en diploteno de la profase I, hasta que se de la estimulación por la LH, y su disminución causa una reanudación parcial de la meiosis (Pan, 2019).

El alto nivel de AMPc, requerido para la detención de los ovocitos en profase I, se mantiene mediante la síntesis y difusión del AMPc en el ovocito a través de GPCR y las uniones gap respectivamente. Los altos niveles de AMPc activan la PKA y esta a su vez es regulada por AKAPS. La PKA a su vez regula la actividad de las proteínas inhibitorias del factor promotor de la maduración (MPF) como Wee1/Myt1 que fosforilan el cdc2, manteniendo así el MPF en su estado inactivo, lo que resulta en una detención meiótica. Además, la PKA fosforila la fosfatasa cdc25 impidiendo que se localice en el núcleo y active el MPF (Aritro, 2013).

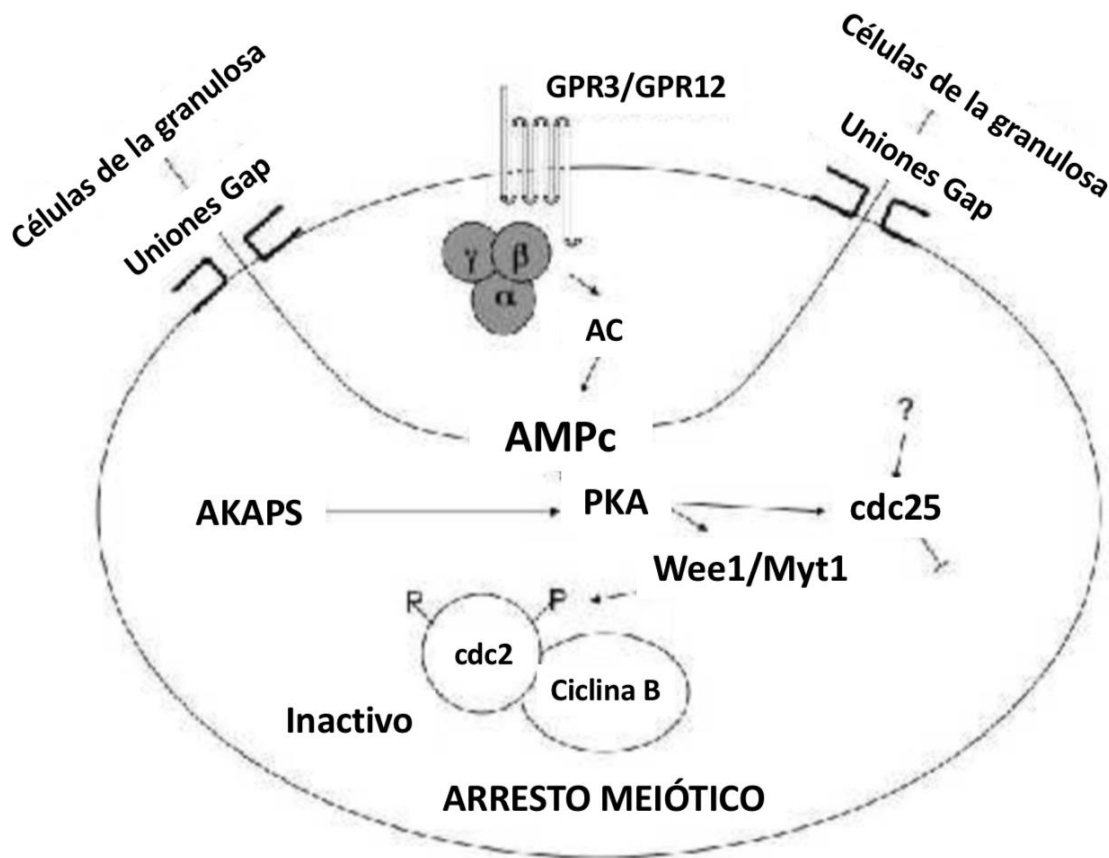


Figura 3. Mecanismo de arresto meiótico del ovocito modificado de Aritro, 2013.

1.1.6 Mecanismo de reanudación meiótica del ovocito

La LH y su receptor LHR inducen la activación de AMPc/PKA y se incrementan en las células de la granulosa murales: la fosforilación de la fosfodiesterasa (GMPc-PDE5), de factores de crecimiento epidérmico (EGF) y su secreción, así como la expresión del receptor de estradiol ER.

La rápida fosforilación de la fosfodiesterasa (cGMP-PDE5) es responsable de convertir el GMPc a 5'GMP lo que provoca la salida por difusión del GMPc y causa la liberación de la actividad de la enzima cAMP-fosfodiesterasa (cAMP-PDE) dentro del ovocito, la cual cataliza al AMPc hacia AMP resultando en la reanudación de la meiosis (Pan, 2019).

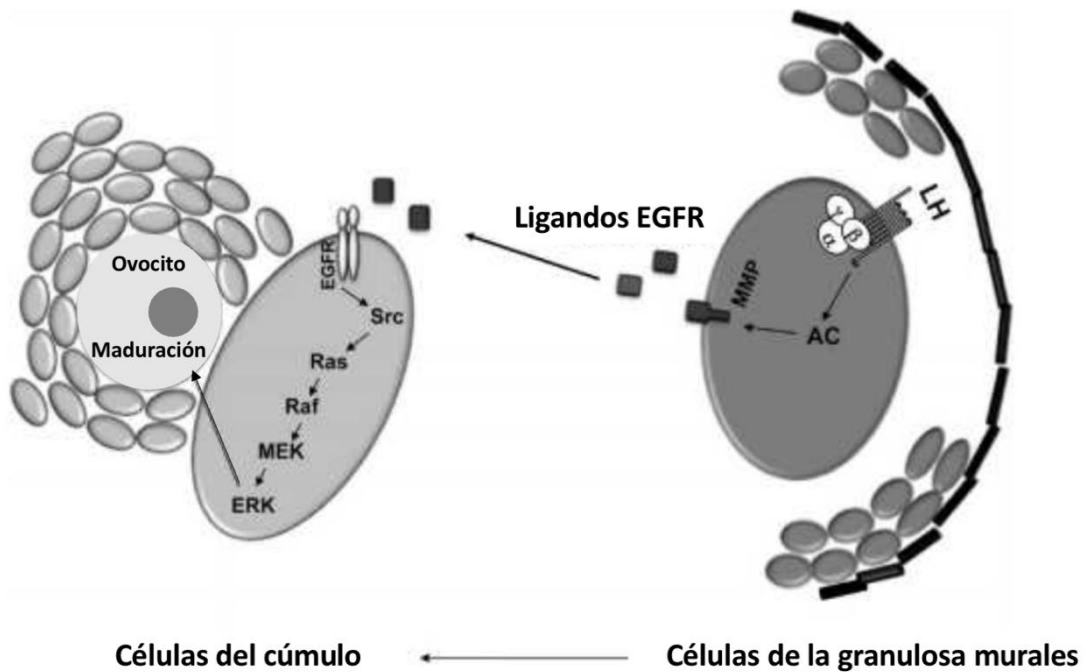


Figura 4. Mecanismo propuesto para la reanudación meiótica del ovocito tomado de Aritro, 2013.

En el receptor de la hormona luteinizante (LHR) que se expresa en células de la granulosa mural, la LH a través de una vía dependiente de AMPc activa la liberación

de ligandos del factor de crecimiento epidérmico (EGF) unidos a la membrana. Estos ligandos actúan de manera autócrina y paracrina en las células del cúmulo a través del EGFR para activar las vías de señalización, incluida la MAPK, promoviendo la maduración de los ovocitos (Aritro, 2013).

1.1.7 Reproducción asistida

Las tecnologías de reproducción asistida (TRA) se refieren a los diferentes procedimientos que, pueden reemplazar o colaborar en uno o más pasos naturales del proceso de reproducción (IIDH Instituto Intramericano de Derechos Humanos, 2008). En ese sentido, permite recuperar la capacidad reproductiva cuando ésta ha sido afectada por algún tipo de patología (Bonilla, 2009).

1.1.8 Fertilización *in vitro*

La fertilización *in vitro* (FIV) es uno de los tratamientos de más frecuente aplicación (Ortiz y Acevedo, 2010), este consiste en poner en contacto a los espermatozoides con los ovocitos en condiciones de laboratorio para lograr la fertilización y el DE inicial fuera del organismo de la mujer en humanos y de hembras de otras especies de mamíferos (SEF Sociedad Española de Fertilidad, 2011).

Este procedimiento consta de cuatro etapas principales:

- 1) Las mujeres y hembras de otras especies de mamíferos se someten a tratamientos para la súperovulación mediante estimulación hormonal.
- 2) Por aspiración mediante laparoscopia se obtienen los ovocitos próximos a su maduración y se recuperan por vía vaginal.

- 3) Se produce la fertilización de los ovocitos en el laboratorio y se desarrolla el cigoto, el cual comienza a dividirse.
- 4) De 24 a 48 horas post-inseminación, se implanta el embrión en el útero donde continúa su desarrollo.

Otro aspecto importante para la FIV es el tiempo de co-incubación de los gametos ya que se ha establecido que este evento puede llevarse a cabo en un periodo de 6 h, aunque otros estudios indican que 3 h son suficientes en la especie porcina (Casillas, 2014).

Además de usarse este método para la reproducción, se utiliza para estudiar *in vitro* diferentes aspectos celulares, bioquímicos y moleculares de la fertilización y DE. Para hacer FIV en aspectos experimentales, se pueden obtener los ovarios de hembras sacrificadas en el rastro para de ellos recuperar los ovocitos inmaduros y llevar a cabo el proceso de maduración.

1.1.9 Desarrollo embrionario

En las mujeres la etapa embrionaria comprende las ocho primeras semanas del desarrollo prenatal y se divide en período presomítico (las tres primeras semanas después de la fertilización) y período somítico (de la cuarta a la octava semana). Una de las principales características de estas ocho semanas es la rapidez con la que ocurren los cambios morfológicos del embrión, tanto externos como internos, que producen importantes modificaciones de un día a otro. El DE humano se ha dividido en 23 estadios que comprenden desde el momento de la fertilización hasta el final de la octava semana de gestación. (Arteaga y García, 2017).

En los cerdos el desarrollo embrionario se ha dividido en 5 estadios que comprenden desde el inicio de la fertilización hasta la unión de pronúcleos en la

singamia, posteriormente está dividido por días llegando al día 5-6 para la formación del blastocisto y de 10 a 12 días para la implantación (Figura 5) (Llobat, 2021).

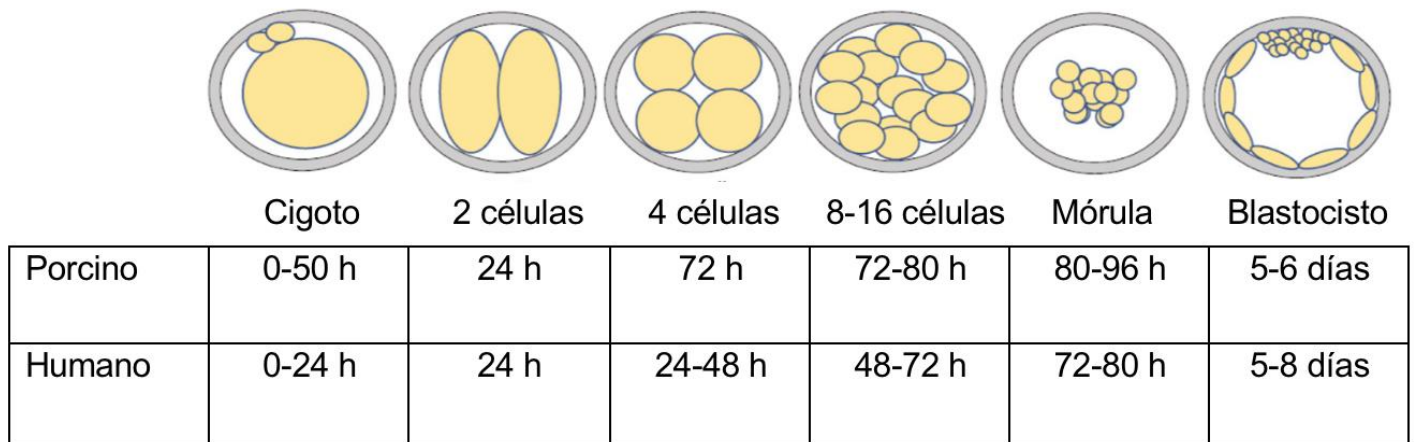


Figura 5. Diferencias del DE en cerdo en comparación con el humano modificado de Llobat, 2021.

Durante los primeros 5–6 días en porcinos y 5–8 días en el humano después de la fertilización y antes de la implantación el cigoto se convierte en un blastocisto que comprende una capa externa conocida como trofoblasto que encierra la cavidad del blastocisto llamada blastocelo, en la que se yuxtapone asimétricamente una población de células de la masa celular interna conocida como embrioblasto, este contiene dos tipos de células el epiblasto y el hipoblasto que posteriormente se distribuirán formando el disco embrionario bilaminar. Se sabe que las células del epiblasto contribuyen a la formación de tejidos del embrión mientras que el hipoblasto a las membranas extraembrionarias (Figura 6) (Rossant, 2022).

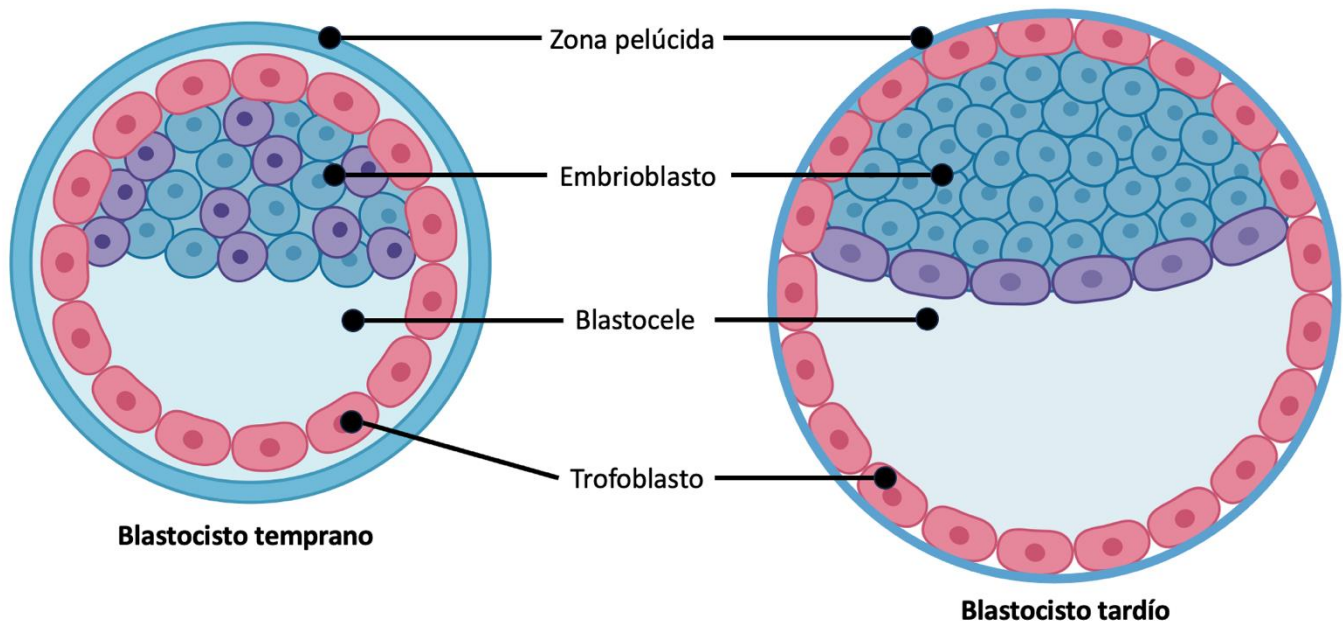


Figura 6. Partes de un Blastocisto y diferencias notables de un temprano y un tardío modificado de Arteaga y García, 2017.

En general la morfología del blastocisto temprano y el tardío es similar, solo que las células del trofoblasto se han aplanado y el blastocelo es más grande en el blastocisto tardío, además el adelgazamiento de la zona pelúcida es más evidente al igual que el aumento en su tamaño (Arteaga y García, 2017).

1.1.10 Calidad embrionaria

Una de las etapas en los tratamientos de FIV es la evaluación de la calidad de los embriones en el laboratorio.

No todos los embriones generados son aptos para transferir o vitrificar, ya que su viabilidad puede estar comprometida. La principal finalidad de la selección embrionaria es la de identificar al embrión con la mayor capacidad posible de

implantación o en el caso de estudios experimentales determinar cuáles son los embriones de buena calidad durante su desarrollo en cultivo (Martinez-Saenz, *et al.*, 2023).

Para determinar cuáles son los embriones de buena calidad, se tienen en cuenta los parámetros marcados por ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción). Estos son los siguientes:

- I. Número de células o blastómeros y ritmo de división
- II. Porcentaje y tipo de fragmentación celular
- III. Simetría: tamaño de los blastómeros en función del estadio
- IV. Visualización de núcleos y multinucleación (más de un núcleo por célula)
- V. Presencia de halo citoplasmático o vacuolas en el citoplasma
- VI. Zona pelúcida (ZP) en buen estado
- VII. Grado de compactación (Martinez-Saenz, *et al.*, 2023).

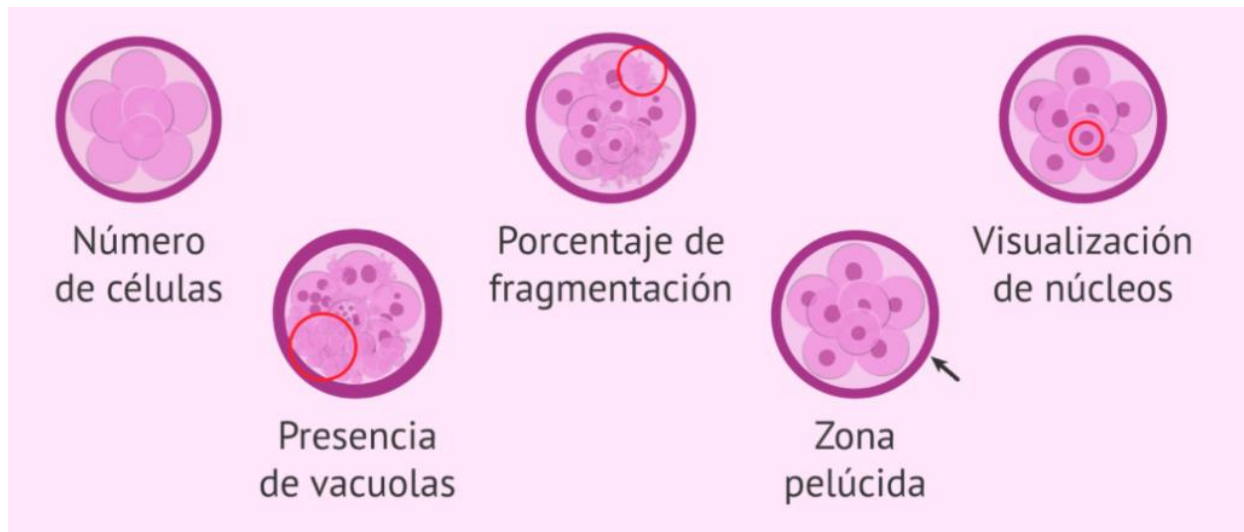


Figura 7. Algunos de los parámetros de calidad embrionaria tomado de Martinez-Saenz, *et al.*, 2023.

1.2 Toxicología Reproductiva

La toxicología reproductiva se define como la rama de la toxicología que estudia los efectos deletéreos producidos por agentes exógenos (xenobióticos) en la reproducción (Rodríguez, 2019), estos pueden ser naturales como el flúor, vanadio, arsénico y algunos metales pesados o sintéticos como ftalatos, insecticidas, herbicidas, perfluorados entre estos se encuentran los parabenos (PBs).

La exposición a los agentes tóxicos puede ocurrir durante toda la vida del individuo, incluyendo la etapa prenatal, que en mamíferos se lleva a cabo en el tracto reproductor de la hembra durante la gestación a través del intercambio de moléculas entre el feto-placenta y la madre. Entre los efectos adversos reportados en la literatura científica se encuentra la disminución de la fertilidad, modificación del ciclo reproductivo, alteraciones endocrinas, teratogénesis, etc. (Gupta, 2011).

En modelos *in vitro* la toxicología reproductiva permite estudiar el efecto potencial de múltiples sustancias en los organismos (Santos y Schoevers, 2014).

1.2.1 Parabenos

Los PBs son ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, según la cadena alquílica se clasifican en metilparabeno (MePB), etilparabeno (EtPB), propilparabeno (PrPB), butilparabeno (BuPB), isobutilparabeno (i-BuPB), isopropilparabeno (i- PrPB), bencilparabeno (BePB) y heptilparabeno (HePB) (Dodge, *et al.*, 2015), de los cuales el MePB y el PrPB son los de uso más frecuente y de forma conjunta (Núñez, *et al.*, 2008).

Todos los miembros de esta clase de compuestos comparten un anillo de benceno, un grupo hidroxilo y un grupo éster en la posición *para* del anillo (Haman, *et al.*, 2015).

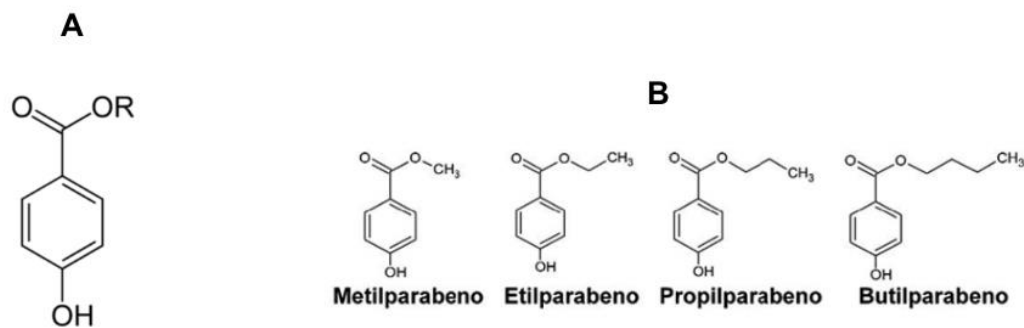


Figura 8. A Estructura química de los PBs. **B** diferencias de la cadena alquílica de los PBs modificado de Haman, *et al.*, 2015.

Los PBs se preparan por esterificación de p-ácido hidroxibenzoico con el alcohol correspondiente en presencia de un catalizador ácido. En general, son estables en el aire y son resistentes a la hidrólisis en agua y en soluciones ácidas (Calafat, *et al.*, 2010). La hidrólisis apreciable ocurre a un pH superior a 7. Varios estudios han sugerido que los PB no se acumulan y conllevan vidas medias cortas de menos de 24 h en el cuerpo humano (Zhang, *et al.*, 2013).

Un incremento en la longitud de la cadena alquílica aumenta la resistencia a la hidrólisis y su efecto antimicrobiano. Sin embargo, cuanto mayor sea la longitud de la cadena alquílica, mayor será la solubilidad en lípidos, lo que conduce a una alta tasa de penetración de PBs en los organismos a través de la epidermis (Jeong, *et al.*, 2020). Aunque son rápidamente metabolizados, la exposición a estos compuestos es muy frecuente y continua (Calafat, *et al.*, 2010).

Sus efectos antimicrobianos interrumpen el sistema transportador de membrana o inhiben las ATPasas y fosfotransferasas (Jeong, *et al.*, 2020) por lo que los PBs son utilizados como conservadores en pastas dentales, productos capilares, desodorantes, cremas, lociones, etc. (Guo y Kannan, 2013). Además de ser empleados en envases y aditivos de alimentos, papel moneda, folletos y periódicos,

también se encuentran en alimentos como carnes, pescados, mariscos, lácteos, cereales, frutas y vegetales (Liao, *et al.*, 2013; Liao y Kannan, 2014). En los productos farmacéuticos, son utilizados como excipientes y agentes para evitar la contaminación microbiana e impedir la degradación de los principios activos (Giulivo, *et al.*, 2016). Su uso puede ser perjudicial para la salud de los usuarios debido a que se han descrito diversos efectos secundarios.

Su uso puede ser perjudicial para la salud de los usuarios debido a que se han descrito diversos efectos secundarios.

Otro aspecto importante es que los PBs se han catalogado como disruptores endocrinos los cuales pueden alterar el equilibrio normal de los sistemas endocrinos, ya que se unen a los receptores de estrógeno porque son estructuralmente similares (Jeong, *et al.*, 2020).

También se ha demostrado que los PBs pueden tener efectos antiandrogénicos al inhibir la transcripción inducida por la testosterona al unirse con el receptor a andrógenos (Quezadas-Fuentes, 2021).

Las fuentes de ingreso de los PBs al organismo puede ser por diferentes vías como ingestión, inhalación y absorción dérmica. Esta última parece ser la ruta más importante de exposición debido a su uso generalizado en productos de cuidado personal; la ingestión puede ser otra ruta importante (Dodge, *et al.*, 2015).

La absorción a través de la piel parece ser más baja en humanos que en otras especies. Los PBs aplicados por vía cutánea son absorbidos por la piel y metabolizados por esterasas. Su absorción depende de la longitud de la cadena del éster. En general, la permeación por la piel disminuye al aumentar la longitud de la cadena. Después de la exposición oral, los parabenos son metabolizados por esterasas en el intestino y el hígado (Vela-Soria, *et al.*, 2014).

1.2.2 Propilparabeno

El Propilparabeno (PrPB) al igual que otros PBs es un compuesto estable y no volátil utilizado como conservante antimicrobiano en alimentos, medicamentos y cosméticos desde hace más de 50 años. Este se absorbe fácilmente a través del tracto gastrointestinal y la dermis en un plazo de 2 h, se hidroliza a ácido p-hidroxibenzoico y posteriormente es conjugado con el ácido sulfato y el ácido glucurónico, los conjugados se excretan rápidamente por la orina en un porcentaje del 8.6% PrPB total (libre + conjugados). No hay evidencia de su acumulación. Los estudios de toxicidad aguda en animales indican que el PrPB es relativamente no tóxico por vía oral y parenteral, aunque es ligeramente irritante para la piel (Mi-Yeong, 2019).

El mecanismo del daño producido por el PrPB parece estar relacionado con la falla mitocondrial dependiente de la permeabilidad de la membrana acompañada de la despolarización mitocondrial y el agotamiento del ATP celular a través del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa al ejercer un efecto inhibitorio significativo sobre el consumo de oxígeno (respiración). En la mayoría de las enzimas oxidativas, el PrPB y BuPB inducen la fuga de material intracelular a través de la pared celular de las bacterias causando daño en la membrana plasmática por este motivo los parabenos son utilizados por sus efectos antibacterianos en una amplia variedad de productos de uso diario (Soni., *et al.*, 2005).

En un estudio en humanos, en sangre y orina se determinaron las características farmacocinéticas del PrPB y sus metabolitos durante 48 h de su administración que fue de 0.6 mg/kg-pc (peso corporal). Se encontró que mediante la ingestión el PrPB se absorbía dentro de las primeras 2 h y se eliminaba rápidamente. La fracción de la dosis administrada excretada en orina fue 0.05% para PrPB libre, 8.6 % para PrPB total (libre+ conjugados), 23.2 % para ácido p-hidroxihipúrico y 7% para ácido p-hidroxibenzoico, lo que sugiere que cuanto mayor sea la longitud de la cadena alquílica, menor será la cantidad excretada de PB total (Shin, *et al.*, 2019).

1.3 Importancia del modelo porcino

El uso del cerdo como modelo experimental se considera adecuado para investigación debido a que su fisiología, anatomía, bioquímica y sistema endócrino es similar al humano (Santos y Schoevers, 2014), ya que su construcción anatómica y morfológica, incluso algunas alteraciones cíclicas son muy similares con los humanos (Lorenzen, *et al.*, 2015).

Las cerdas poseen un ciclo estral de 21 días, donde el primer día se presenta la ovulación. Este se clasifica de acuerdo a su comportamiento sexual, en el que el estro y proestro son las etapas receptivas, y el diestro y el metaestro son las etapas donde no hay receptividad sexual. En comparación con la mujer el ciclo se denomina ciclo menstrual, tiene una duración de 28 días, la etapa final de la menstruación (fase lútea) se caracteriza por la presencia de sangrado denominado menstruación, que se presenta el primer día del ciclo, siendo el día 14 el día donde ocurre la ovulación. Durante todo este periodo menstrual, las hembras son receptivas a los machos (Senger, 2005).

2. Antecedentes

2.1 Parabenos en la reproducción

Un estudio en humanos mostró que altas concentraciones de PBs en la orina se asocian con reducción en la fertilidad en las parejas (Smarr, *et al.*, 2017). Sin embargo, en otro estudio en mujeres sometidas a programas de FIV, las concentraciones urinarias encontradas de MePB (133 µg/L), PrPB (24 µg/L) y BuPB (1.5 µg/L) no se asociaron con los resultados de la FIV, específicamente con el recuento de ovocitos totales maduros, las tasas de fertilización y la proporción de embriones de alta calidad. Además, las asociaciones no fueron significativas entre las concentraciones de PBs en orina y las tasas de implantación y nacidos vivos (Mínguez-Alarcón, *et al.*, 2016).

Se ha observado que después de 24 h de su administración, la mayoría de los PBs son metabolizados y se excretados por la orina (Janjua, *et al.*, 2008). Cuando la exposición a productos de cuidado personal que contienen PBs se aplica frecuentemente sobre la piel, estos, se acumulan en los tejidos subyacentes como en el tejido mamario (Dabre, *et al.*, 2004). Las regulaciones de la Union Europea exigen que las mezclas de los PBs se pueden usar en concentraciones de hasta 0.8% en cosméticos y productos de cuidado personal, mientras que un solo PB se puede presentar en concentraciones de hasta 0.4%. El Informe Nacional sobre Exposición Humana a Químicos Ambientales de la población de EUA entre 2005-2006, reportó la presencia de MePB en un 99.1% y PrPB en 92.7% de los participantes, mientras que el BuPB se detectó en un 40%, el estudio fue en concentraciones de orina expresado en $\mu\text{g/g}$ de creatinina (Dodge, *et al.*, 2015).

En un estudio observacional en humanos se obtuvieron muestras de orina de 315 hombres que asistieron a una clínica de reproducción asistida en Polonia, con fines de diagnóstico por infertilidad estas personas presentaron una concentración normal de semen de 15 a 300 millones/ml, las muestras fueron analizadas utilizando un método de espectrometría de masas y cromatografía de gases para detectar concentraciones de cinco PBs (EtPB, MePB, PrPB, BuPB, iBuPB) y como pueden comprometer la fertilidad. El resultado se asoció con un aumento en el porcentaje de espermatozoides con anomalías, además disminución de la movilidad y bajos niveles de testosterona y un incremento en el daño al ADN (Jurewicz, *et al.*, 2017).

En otro estudio sobre la expresión del receptor de estradiol (ERR α) humano encontraron que el MePB, EtPB, PrPB, BuPB e BzPB mostraron funciones antagonistas al receptor de estradiol, lo que confirma las fuertes actividades de unión de los PBs a ERR α y su papel en la carcinogénesis de mama humano. Además, los PBs parecen tener efectos significativos en los pacientes con cáncer de mama que estén tomando tamoxifeno, ya que ERR α se considera un objeto de tratamiento para el tamoxifeno (Zhang, *et al.*, 2013).

Experimentos en roedores recibieron inyecciones subcutáneas diarias de MePB, PrPB y BuPB durante los días 1-3 neonatales. Los ovarios se extirparon el día postnatal 8, se fijaron y tiñieron con hematoxilina y eosina para su análisis histológico. En altas dosis de PBs se observó un aumento en los folículos primordiales y la disminución en el número de folículos primarios tempranos, estos datos muestran que estos PBs promueven la expresión de ARNm de la hormona antimülleriana, promoviendo el incremento de los folículos primordiales y la inhibición de la fase temprana de la foliculogénesis en los ovarios de ratas hembras neonatales, los niveles de enzimas esteroides, indicadores de diferenciación folicular, parecieron estar regulados por los PBs a través de la inhibición de genes como *Foxl2* que participan en la diferenciación de células somáticas y germinales del ovario en el desarrollo del folículo, lo que demuestra su acción como xenoestrógenos, una clase de disruptores endocrinos (Ahn, 2012).

En ratas prepúberes expuestas a mezclas de MePB, EtPB, PrPB, iPrPB, BuPB e iBuPB a diferentes dosis (62.5, 250 y 1000 mg/kg pc/día) por vía oral, se presentó retraso en la apertura vaginal, disminución en la duración del ciclo estral y anomalías histopatológicas en los órganos reproductivos. En cuanto a la histología realizada en el ovario se observó reducción de cuerpos lúteos, adelgazamiento del epitelio folicular e incremento en el número de quistes foliculares. Además, los estudios morfológicos del útero mostraron hipertrofia miometrial debido a dosis alta de PrPB e iBuPB (1000 mg/kg-día), también se presentó afinidad de unión de los PBs a los receptores de estrógeno. En conclusión, la exposición a largo plazo de los PBs puede producir efectos supresores sobre la respuesta hormonal y puede alterar la morfología de los tejidos diana reproductivos (Vo, *et al.*, 2010).

En un estudio realizado en una provincia de Granada España se realizó un nuevo método de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem para evaluar la presencia de los parabenos más utilizados en aplicaciones industriales (MePB, PrPB, EtPB, BuPB) en muestras de tejido placentario humano. El MePB se detectó en el 96% de las muestras analizadas, el EtPB en el 66%, el PrPB en el 90% y el BuPB en el 16%, por lo que se infiere que éstos se pueden acumular en el líquido

amniótico y provocar efectos adversos en la salud y descendencia (Jimenez-Díaz, *et al.*, 2011).

In vitro se encontró que el i-BuPB puede ocasionar daño en la MIV de ovocitos porcinos. Los resultados proporcionan evidencia que a concentración de 200 μM la extrucción de cuerpos polares se vio afectada. En concentración de 400 μM la expansión de las células del cúmulo disminuyó significativamente, además se observaron anomalías en la progresión de la maduración, generando afectaciones en el citoesqueleto, estrés oxidante, apoptosis temprana y modificación epigenética de cationes (Meng, *et al.*, 2020).

Otro estudio reciente *in vitro* en porcinos demostró que, a concentraciones de 500, 750 y 1000 μM de MePB, se observaron alteraciones en la morfología de los ovocitos con daño en el citoplasma y una reducción de la expansión de las células del cúmulo durante la maduración; sin embargo, la viabilidad no se vio comprometida. La maduración de los ovocitos disminuyó de una manera dependiente de la concentración después de 44 h de la exposición al MePB. Por lo tanto, la exposición a este PB puede ser uno de los factores implicados en el deterioro de la fertilidad en los mamíferos, incluidos los seres humanos (Barajas-Salinas, *et al.*, 2021).

2.2 Parabenos en el desarrollo embrionario

Un estudio *in vitro* utilizando concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 μM de BuPB durante la maduración de ovocitos porcinos y el subsiguiente DE mostró que la maduración se vio afectada a 300 μM , además la expansión de las células del cúmulo disminuyó significativamente así como ovocitos en metafase II en comparación con el control. Por consiguiente la tasa de fertilización disminuyó significativamente así como también la escisión embrionaria y formación de blastocistos con un menor número de blastómeros y un mayor porcentaje de apoptosis en comparación con el control.

Lo anterior se atribuyó a que la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), produjo niveles bajos de glutatión (GSH), interrupción de la función mitocondrial, el desencadenamiento de daño en el ADN y la generación de apoptosis temprana (Jeong, *et al.*, 2020).

3. Justificación

El PrPB es usado como conservador de productos de higiene personal y preservador de alimentos, por lo que los humanos y otros mamíferos están expuestos a este compuesto que pueden afectar a la salud reproductiva. Aunque existen diversos estudios acerca del efecto de otros PBs en la reproducción, hay pocos estudios acerca del efecto del PrPB. Se debe resaltar la importancia de los estudios *in vitro*, ya que permiten proponer posibles mecanismos por los cuales los PBs pueden ocasionar daño a la salud reproductiva. El porcino se considera un modelo adecuado para la investigación aplicada a humanos debido a que su fisiología, anatomía, bioquímica y sistema endocrino es similar.

Por lo anterior se propone la siguiente pregunta de investigación.

4. Pregunta de investigación

¿Qué efecto tiene el PrPB en el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos hasta la etapa de blastocisto?

5. Hipótesis

El PrPB altera la maduración nuclear de ovocitos porcinos *in vitro* y afecta en el DE, retrasando el desarrollo, impidiendo que se alcance la etapa de blastocisto o propiciando embriones de mala calidad.

6. Objetivo general

Evaluar el efecto del PrPB, en presencia de diversas concentraciones durante el proceso del DE *in vitro* en el modelo porcino.

6.1 Objetivos particulares

- Evaluar la viabilidad de los embriones expuestos a diversas concentraciones de PrPB.
- Determinar si se presentan cambios en la morfología celular y número de blastómeros en los embriones expuestos a diversas concentraciones de PrPB a las 144 h de DE, así como en el número de blastocistos formados.
- Determinar si las concentraciones del PrPB al ir en aumento retrasan o detienen el DE en sus diversas etapas.

7. Diseño de investigación

El diseño de esta investigación se muestra en la Figura 9:

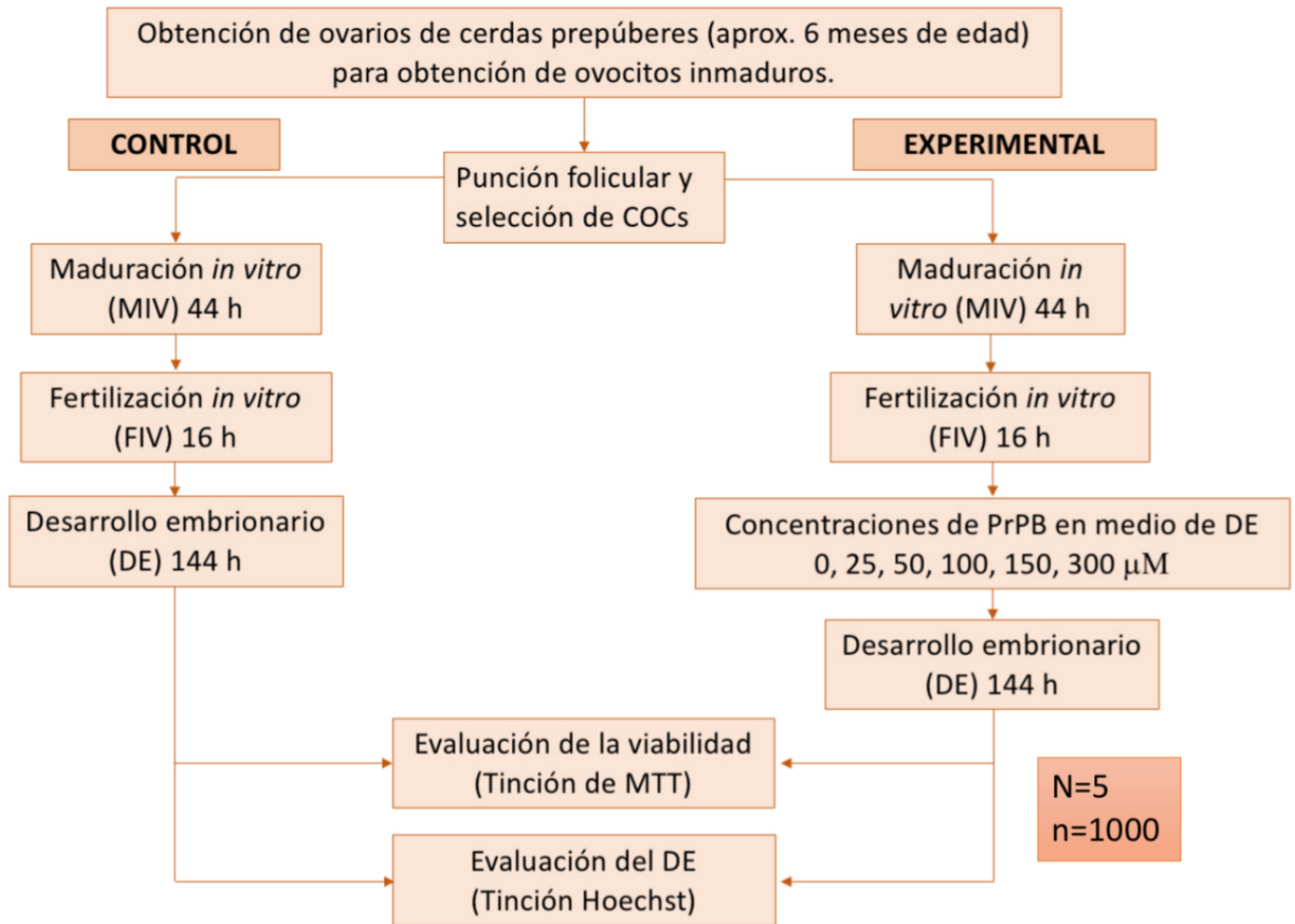


Figura 9. Diseño experimental

Las concentraciones utilizadas se seleccionaron de acuerdo con estudios *in vivo* (Shin, *et al.*, 2019). Además, estas ya fueron probadas *in vitro* en el laboratorio para estudiar el efecto del MePB (Barajas-Salinas, *et al.*, 2021) y PrPB (Núñez-Macías, 2019).

8. Metodología

8.1 Obtención de ovarios, punción folicular y colecta de COCs

Todos los reactivos empleados fueron de la marca Sigma Chemical Co. (EUA), a menos que se especifique lo contrario.

Se obtuvieron ovarios de cerdas prepúberes de aproximadamente 6 meses de edad, sacrificadas en el rastro (Los Arcos, Edo. De México) y se transportaron al laboratorio en solución salina de NaCl 0.157 M, a una temperatura de entre 25 y 28°C. Al llegar al laboratorio, en un lapso no mayor a 2 horas, los ovarios se lavaron los ovarios con solución salina, se puncionaron los folículos que medían entre 3 y 6 mm para la obtención del fluido folicular que contiene los complejos ovocitos–células el cúmulo (COCs). Para esto se usó una aguja de calibre 18 fijada a una jeringa desechable de 10 mL. El fluido folicular colectado se dejó sedimentar por 20 min en un tubo de 50 mL con fondo cónico. El paquete celular se lavó dos veces, dejando sedimentar 15 min entre cada lavado, con 20 mL de la solución de Tyrode suplementada con 10 μ M de lactato de sodio 0.50 μ M de HEPES y 0.01 % de polivinil alcohol (TL-HEPES PVA) a un pH de 7.3 a 7.4.

8.2 Maduración *in vitro*

El paquete celular se resuspendió y se transfirió a cajas Petri de 60 mm de diámetro para la colecta de COCs. Se seleccionaron aquellos con citoplasma uniforme y con al menos tres capas de células del cúmulo. Para retirar los restos celulares se lavaron tres veces en 500 μ L de medio de maduración TCM-199 suplementado con sales de Earle y bicarbonato de sodio (In Vitro, México), glucosa 3 μ M, piruvato de sodio 0.91 μ M, alcohol polivinílico 0.1% (v/v), cisteína 0.57 μ M, factor de crecimiento epidermal 10 ng/mL, penicilina 75 μ g/mL y estreptomina 1 μ g/mL; posteriormente se depositaron 50 ovocitos en cada pozo en una caja de 4 pozos (Nunc, EUA) con 500 μ L de este medio de maduración suplementado (In Vitro, México), en cada pozo el medio se suplemento con 5 μ g/mL de FSH y 5 μ g/mL de LH (merional 75 UI

IBSA) finalmente los pozos se cubrieron con aceite mineral y se incubaron a 38.5 °C con 5 % CO₂ por 44 horas (Ducolomb, *et al.*, 2012).

Los criterios de maduración nuclear fueron los siguientes: ovocitos con vesícula germinal (VG): inmaduros; en metafase I (MI): inmaduros; en vías de maduración y en metafase II (MII): maduros (Casas, *et al.*, 2010).

8.3 Fertilización *in vitro*

Después de la maduración *in vitro* (MIV), las células del cúmulo se removieron con una micropipeta de 100µL mediante acción mecánica. Los ovocitos desnudos se lavarón con medio de maduración TCM-199 suplementado y tres veces con el medio amortiguado con Tris modificado (TBMm) en gotas de 500 µL cubiertas con aceite mineral. Para la fertilización *in vitro* (FIV), se colocaron 50 ovocitos en gotas de 50 µL de medio TBMm cubiertas con aceite mineral y se incubaron a 38.5 °C con 5% de CO₂ y humedad a saturación hasta la inseminación (aproximadamente 45 min) (Ducolomb *et al.*, 2005).

8.4 Preparación de la muestra de semen

La muestra de semen se obtuvo mediante el método de la mano enguantada en una granja comercial, se registraron los datos de la raza así como la fecha de obtención de la muestra, posteriormente se transportó en un diluyente comercial al laboratorio en un máximo de 2 h a una temperatura de 16°C, la botella se envolvió en una franela dentro de una caja de unicel para su protección contra la luz y ya en el laboratorio esta se cubrió en papel aluminio y se almacenó en refrigeración a 16 °C.

La suspensión se centrifugó a 600 rpm (61 x g) durante 5 min y se conservó el sobrenadante que contenía a los espermatozoides vivos. Cinco mL del

sobrenadante con los espermatozoides se diluyó 1:1 con PBS-Dulbecco (In Vitro) y se centrifugó a 3500 rpm (1900 x g) por 5 min. Se desechó el sobrenadante, el paquete celular con los espermatozoides se suspendió en 10 mL de PBS Dulbecco y se centrifugó nuevamente a 3500 rpm (1900 x g) por 5 min. El paquete celular se diluyó con 100 µL de medio Tris modificado (TBMm) y se hizo la dilución necesaria para que al agregar 50 µL de la suspensión de espermatozoides a la gota del medio de FIV TBMm con los ovocitos y se obtuviera una concentración final de 5×10^5 espermatozoides/mL. Para preparar la concentración final se contaron los espermatozoides en una cámara de Neubauer.

La movilidad de los espermatozoides se determinó colocando una gota de la muestra en un portaobjetos precalentado a 38 °C, la muestra se observó en un microscopio óptico a 40X. Se consideró la muestra de semen de buena calidad con una estimación de al menos 70% de movilidad, con movimiento progresivo lineal.

Los ovocitos y los espermatozoides se incubaron durante 6 h en las condiciones antes descritas (Ducolomb, *et al.*, 2012).

Para realizar el DE después del periodo de 6 h de coincubación, con el fin de retirar los espermatozoides, los ovocitos se lavarón tres veces en gotas de 50 µL de medio de desarrollo "North Carolina State University-23" (NCSU-23) suplementado con BSA al 0.4% libre de ácidos grasos para retirar los espermatozoides. Los ovocitos se colocaron en gotas de 500 µL del mismo medio cubiertas con aceite mineral en cajas de cuatro pozos y se incubaron en las mismas condiciones. A las 144 h de incubación se observaron los embriones para determinar su estado de desarrollo (Ducolomb, *et al.*, 2012).

8.5 Tratamiento con PrPB

La dilución del PrPB se realizó con medio de desarrollo NCSU-23 para obtener la concentración stock de 2.56 mM y a partir de ella se obtuvieron las concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 300 µM y se agregaron a los pozos después de la coincubación con los espermatozoides.

8.6 Criterios de evaluación de viabilidad

La evaluación de viabilidad y maduración se llevó a cabo en el mismo ovocito mediante una doble tinción con bromuro de tetrazolio (MTT) y bisbenzimidida (Hoechst). Para esto, se retiraron las células del cúmulo y los ovocitos se incubaron en MTT (5 mg/mL), en 500 μ L de PBS por 30 min. En la Figura 10 se muestra el criterio de evaluación de la viabilidad de ovocitos, aquellos que presentaron una coloración púrpura se consideraron como vivos y aquellos que se presentaron incoloros fueron considerados muertos.

La tinción con MTT se usó debido a que su mecanismo de acción se debe principalmente a la actividad metabólica de las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa, aunque también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimientos subcelulares. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en formazán el cual aporta el color púrpura a la célula.

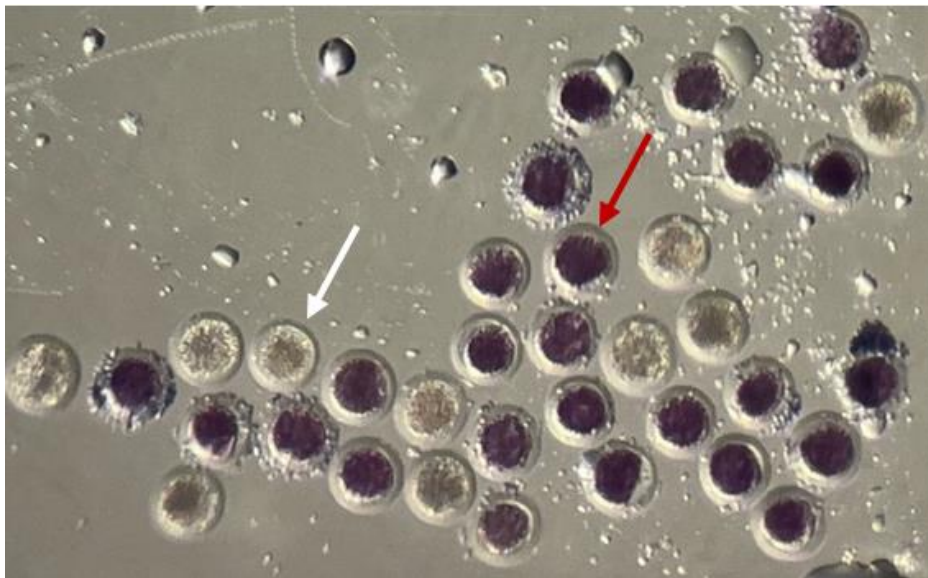


Figura 10. Evaluación de viabilidad con Bromuro de tetrazolio (MTT) Se muestran los ovocitos vivos en color púrpura (flecha roja) y los ovocitos muertos sin color (flecha blanca). Microscopio óptico 40X.

8.7 Criterios de evaluación de la MIV

Para evaluar las etapas de maduración nuclear después de las 44 h de incubación, los ovocitos fueron teñidos con 500 μ L de bisbenzimidida (Hoechst) que por su composición química son utilizados para teñir el ADN, debido a su afinidad a la unión en regiones de doble cadena del ADN ricas en AT (Adenina-Timina); los ovocitos fueron aislados de la luz a 4°C por 40 min, posteriormente fueron fijados con glutaraldehído al 2% por 20 min igualmente a 4°C y se colocaron en un portaobjetos con glicerol-PBS (1:9) para su posterior evaluación.

Se determinó el número de ovocitos madurados (metafase II) que presentaron el primer cuerpo polar, en proceso de maduración (metafase I) e inmaduros (vesícula germinal) (figura 11).

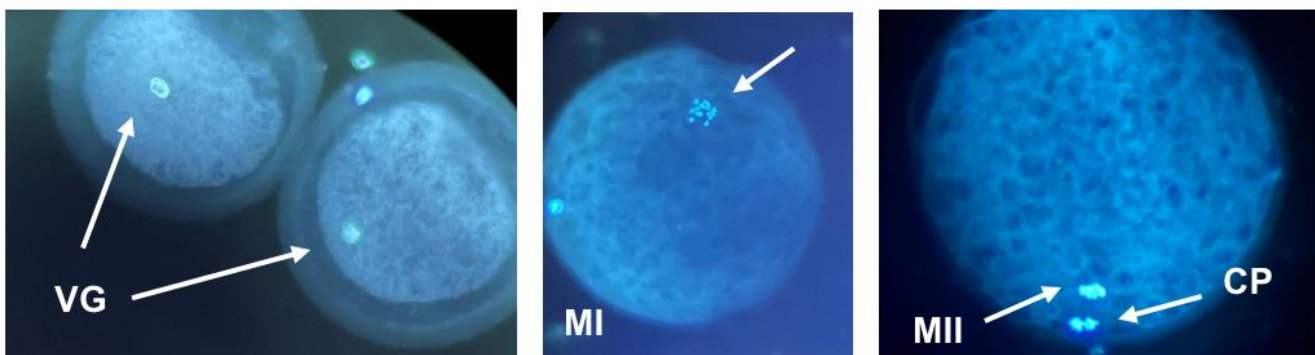


Figura 11. Evaluación del estado de maduración nuclear de los ovocitos. VG (vesícula germinal): inmaduros, MI (metafase I): en proceso de maduración, MII (metafase II + el primer cuerpo polar): maduros Tinción de Hoechst. Microscopia de fluorescencia 400X.

8.8 Análisis estadístico

- Para evaluar la viabilidad y maduración de los ovocitos, así como el número y viabilidad de embriones y de blastómeros producidos en cada

concentración de PrPB, se realizó la prueba de X^2 con un valor de confianza cuando $P < 0.05$.

- Para determinar el efecto de las concentraciones del PrPB en la maduración de ovocitos, determinar la frecuencia de blastocistos de acuerdo a la concentración de PrPB, se utilizó la correlación de Spermán.

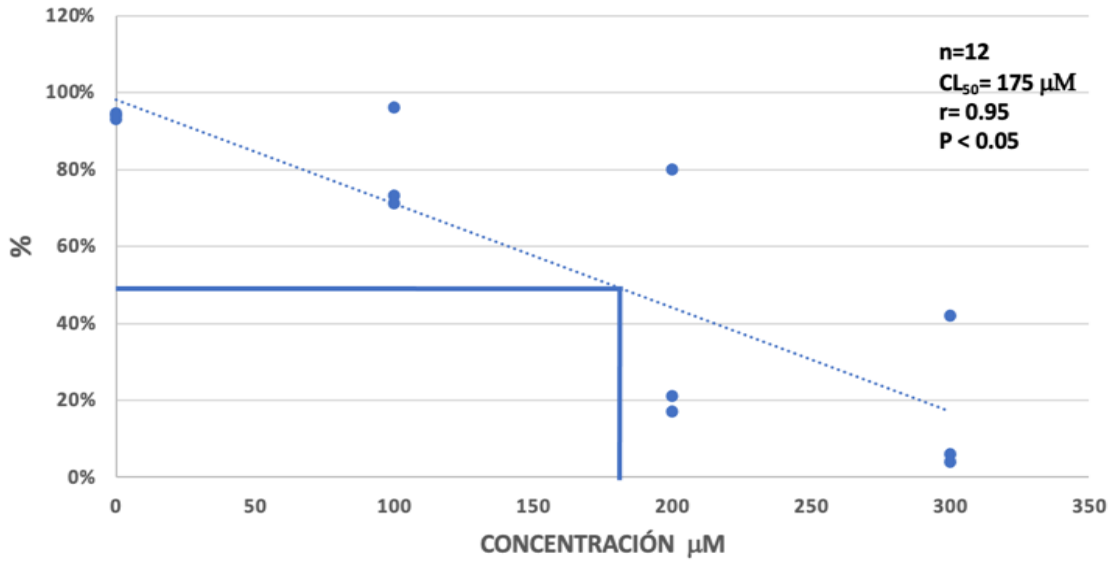
9. Resultados

9.1 Efectos del PrPB en la viabilidad durante la maduración in vitro

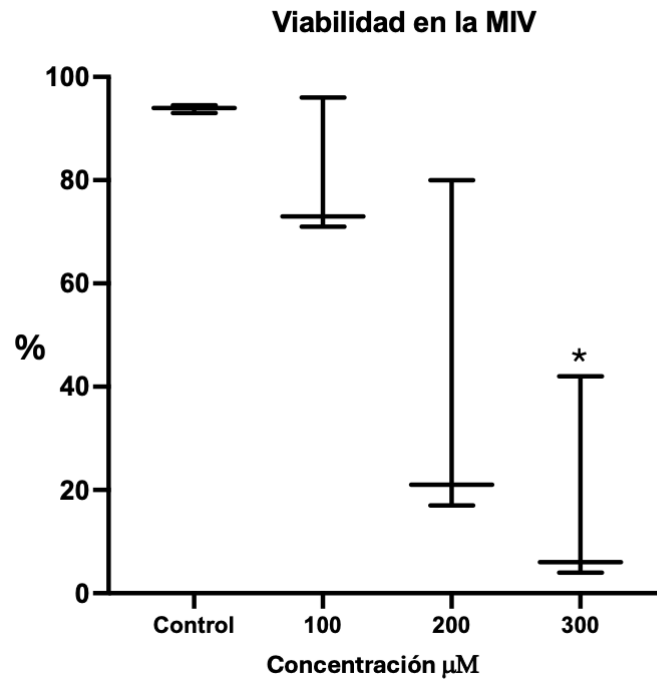
El efecto del PrPB en la viabilidad durante la MIV fue evaluado a concentraciones de 0, 100, 200 y 300 μM después de 44 h de incubación, se contabilizó el número total de ovocitos vivos por cada concentración utilizada y se procedió a graficar los datos obtenidos en donde el 94% de los ovocitos del grupo control se encontraban vivos y este porcentaje fue reduciendo después del aumento de las concentraciones de PrPB como se muestra en la Gráfica 1.

Se observó una relación concentración dependiente en la viabilidad ya que a medida que aumentaba la concentración de PrPB hubo un descenso en esta con respecto al control. Con los resultados obtenidos se realizó la estimación de la concentración letal₅₀ (ECL₅₀) la cual fue de 175 μM . En la Gráfica 2 se muestra que la concentración 300 μM hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

VIABILIDAD EN LA MIV



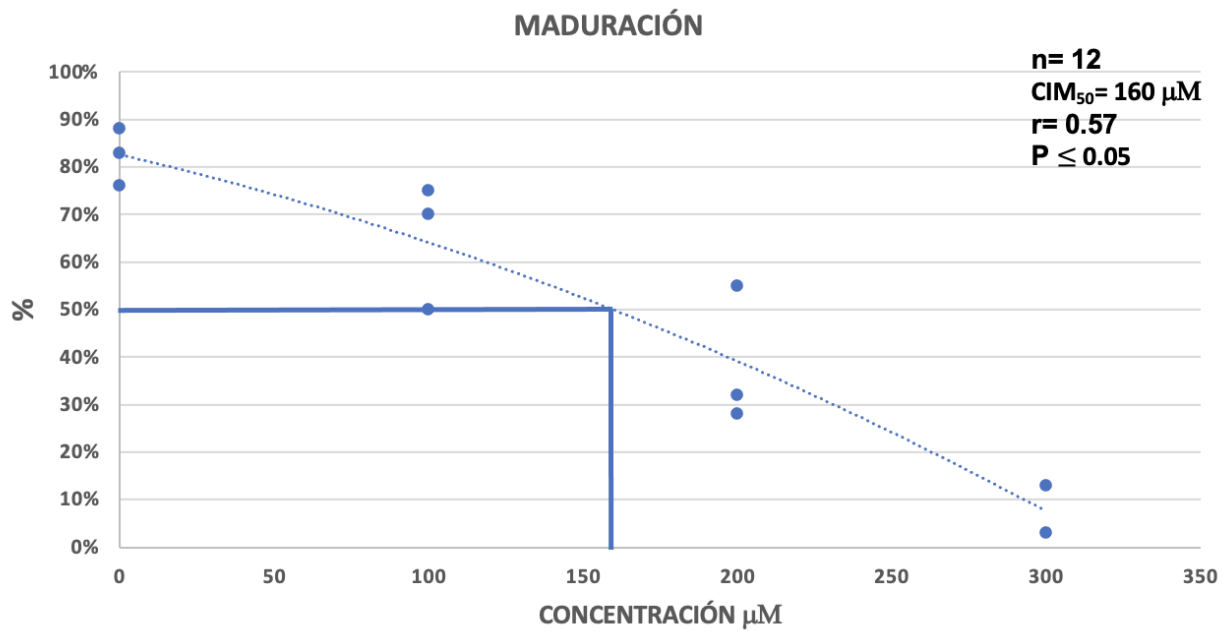
Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad en la MIV. n= número de células evaluadas, CL_{50} = concentración letal 50.



Gráfica 2. Porcentaje de viabilidad en la MIV.
*concentración estadísticamente significativa con respecto al control.

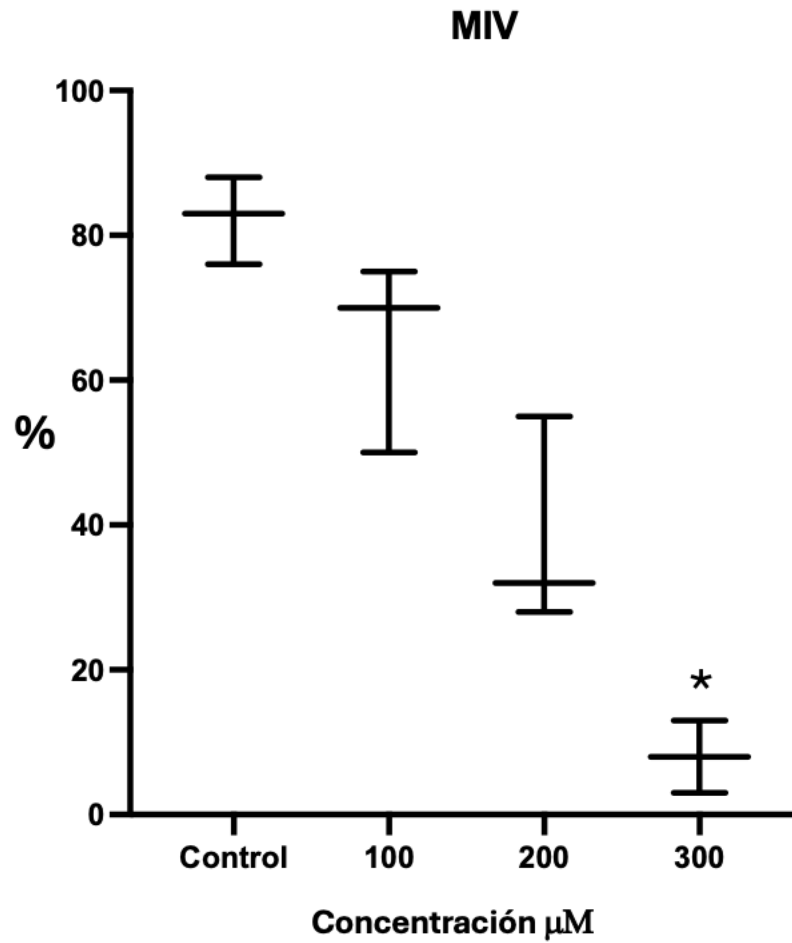
9.2 Efecto del PrPB en la MIV de ovocitos

En la Grafica 3 se muestran los resultados obtenidos de la MIV. El grupo control presentó un porcentaje de maduración del 82%, en la concentración 100 μM 65%, en la concentración 200 μM 38% y en la concentración 300 μM 8%. Se puede observar una disminución concentración-dependiente después de la exposición al PrPB. La Concentración de Inhibición de la Maduración₅₀ (CIM₅₀) fue de 160 μM .



Gráfica 3. Efectos del PrPB en la MIV n= número de células evaluadas, CL₅₀= concentración letal 50.

Al igual que en la viabilidad la concentración 300 μM presentó diferencia estadísticamente significativa con respecto al control:



Grafica 4. *diferencia estadísticamente significativa respecto al control con una p 0.05

9.3 Efectos del PrPB en el desarrollo embrionario

La evaluación del DE se registró a las 144 h después de la fertilización. Se cuantificó el número total de embriones divididos mediante el microscopio invertido en campo claro para su cuantificación y posteriormente fueron evaluados por doble tinción con Bromuro de Tetrazolio (MTT) para la viabilidad y con Bisbenzimidida (Hoescht) para la cuantificación del número de núcleos.

En la Figura 12 se muestran los diferentes estadios de desarrollo de embriones después de 144 h, considerados de buena calidad, obtenidos en el presente estudio. En el modelo porcino a las 24 h post fertilización en condiciones normales, se deben observar embriones de 2 blastómeros, a las 72 h embriones de 4 blastómeros, entre 72 y 80 h embriones de 8 a 16 blastómeros, de 80 a 96 h mórulas y a las 144 h blastocistos, sin embargo, en estudios *in vitro* no todos los embriones llegan a la etapa de blastocisto por lo que es común encontrar diferentes estadios embrionarios.

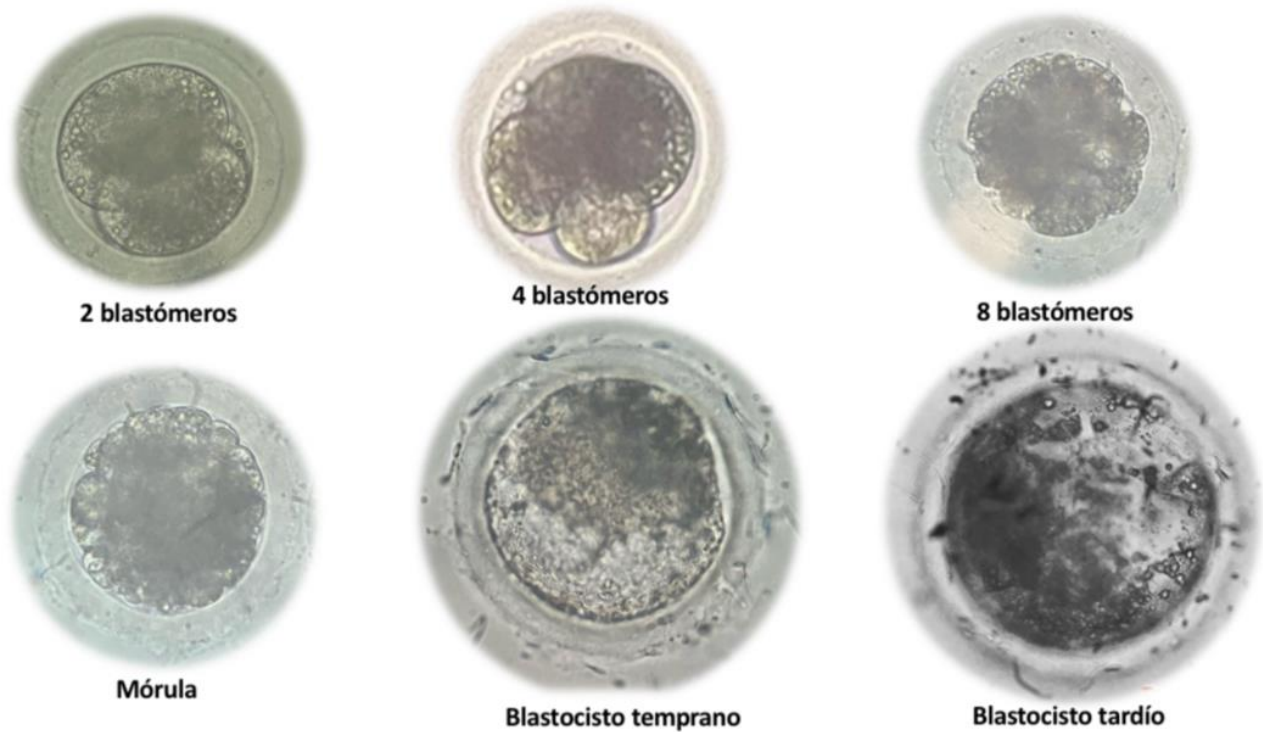


Figura 12. Embriones en diferentes etapas de desarrollo después de 144 h de DE. Se muestran embriones de 2, 4, 8 blastómeros, mórula y blastocisto temprano y tardío en donde ya se puede observar un adelgazamiento de la zona pelúcida. Microscopio invertido, campo claro 40X.

En la Figura 13 se observan algunos estadios embrionarios encontrados en el grupo control, teñidos mediante la técnica de Hoechst. En esta imagen se muestra un embrión de dos blastómeros en el cual se pueden observar sus núcleos teñidos, hacia la derecha se observan uno con cuatro núcleos, otro de 8 núcleos e incluso en este mismo se observa un núcleo elongado lo que podemos inferir que estaría por dividirse (flecha blanca). También se observa una mórula cuyo número de núcleos supera los 16. Después está un blastocisto temprano cuyos núcleos son más pequeños y difícil de contabilizar en su totalidad. Seguido de ese está un

blastocisto tardío que se distingue sobre todo por el adelgazamiento de la zona pelúcida, su mayor tamaño y la posición de los núcleos.

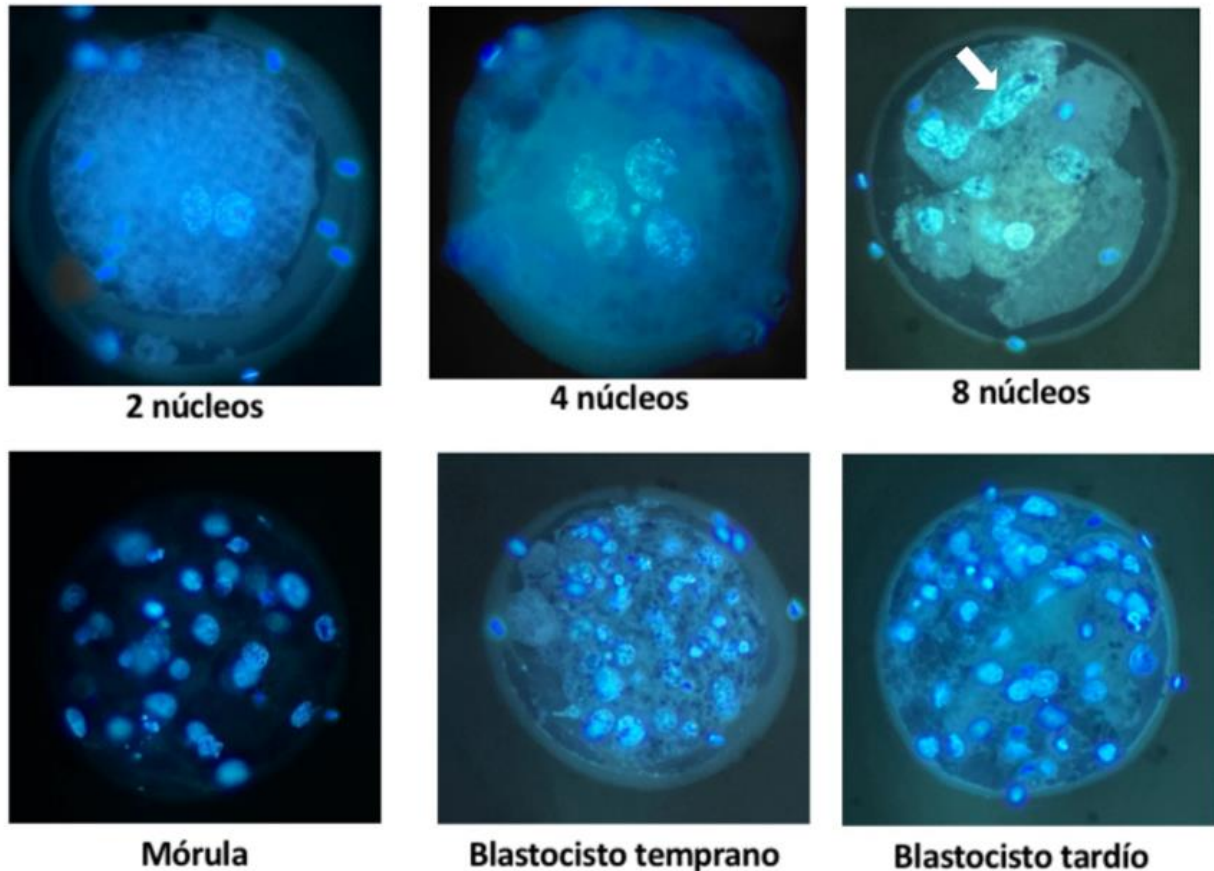


Figura 13. Embriones en diferentes etapas de desarrollo después de 144 h teñidos con Hoechst observados a 40X Se muestran embriones de dos núcleos, 4 núcleos, 8 núcleos, mórula y blastocisto temprano y tardío en donde ya se puede observar un adelgazamiento de la zona pelúcida.

Para la viabilidad igual como sucedió en la MIV el DE fue evaluado mediante la tinción con MTT. El grupo control no se vió afectado (Figura 14), de hecho los embriones que se tiñeron de color púrpura mostraban DE.

En la Figura 14 además se observan embriones en diferentes estados de desarrollo de un grupo control, hay embriones de 2, 4, 8 blastómeros, mórulas y algunos

blastocistos tanto tempranos como tardíos. Sin embargo, a medida que aumentaba la concentración del PrPB se mostró un patrón de descenso, como se muestra en la Figura 15.

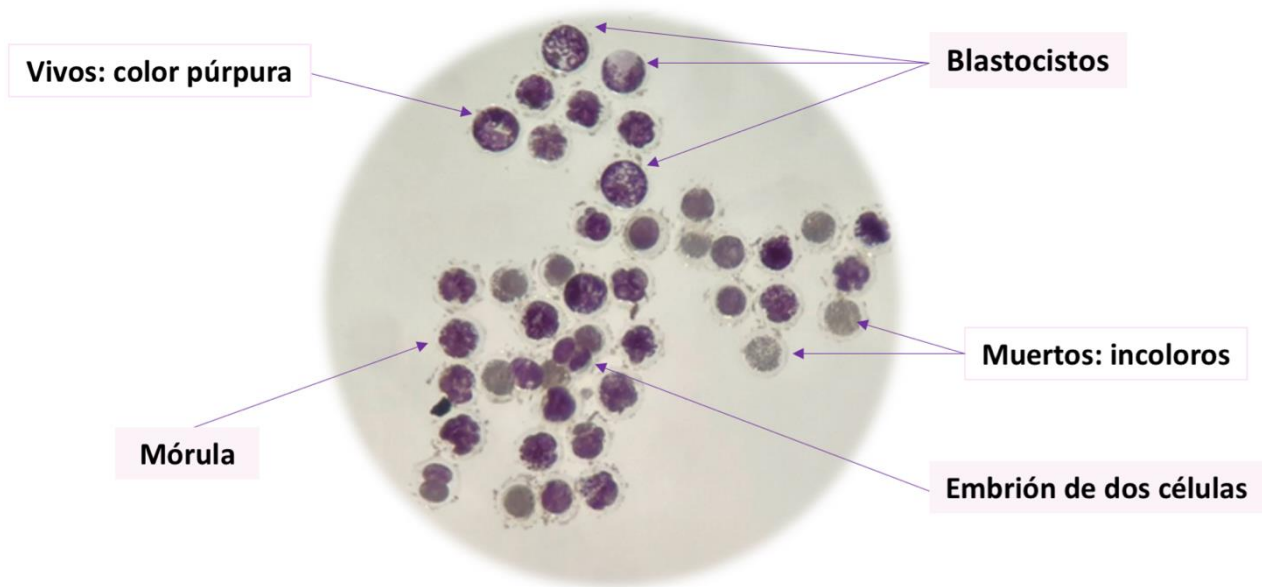


Figura 14. Viabilidad de embriones teñidos con bromuro de tetrazolio (MTT) grupo control después de 144 h de DE. La imagen que se muestra es de un grupo control en el cual se observan embriones en distintas etapas de desarrollo y número reducido de embriones muertos. Microscopio óptico 40X

En todos los ensayos realizados se observó un patrón de descenso de la viabilidad (Figura 15) así como también de DE. En las concentraciones 25 y 50 μM no se observó una diferencia significativa, mientras que a partir de la concentración 100 y 150 μM se observa un descenso notorio, ya en la concentración de 300 μM de PrPB no se observa viabilidad ni DE. Se contabilizó el número de embriones vivos y los resultados se muestran en la Gráfica 5.

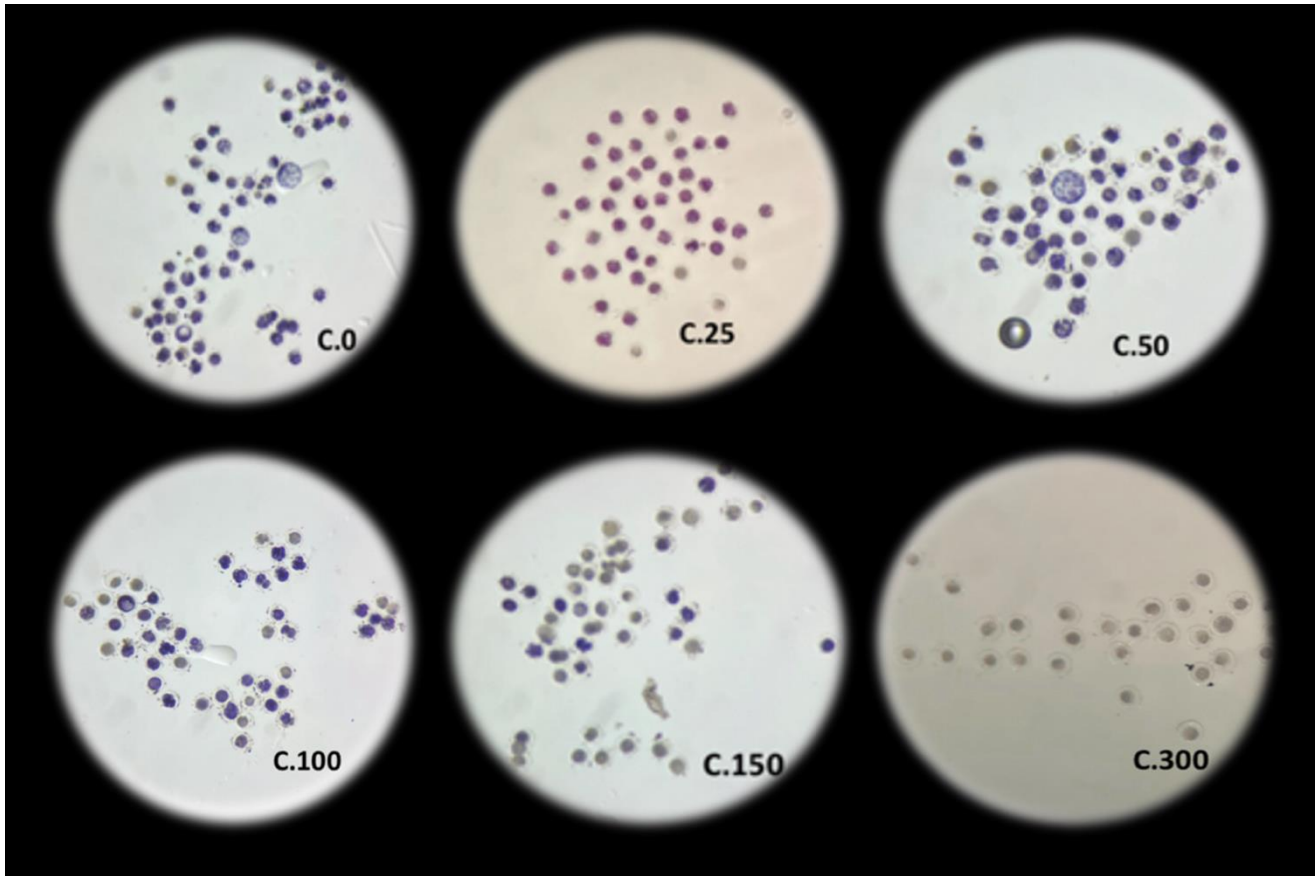
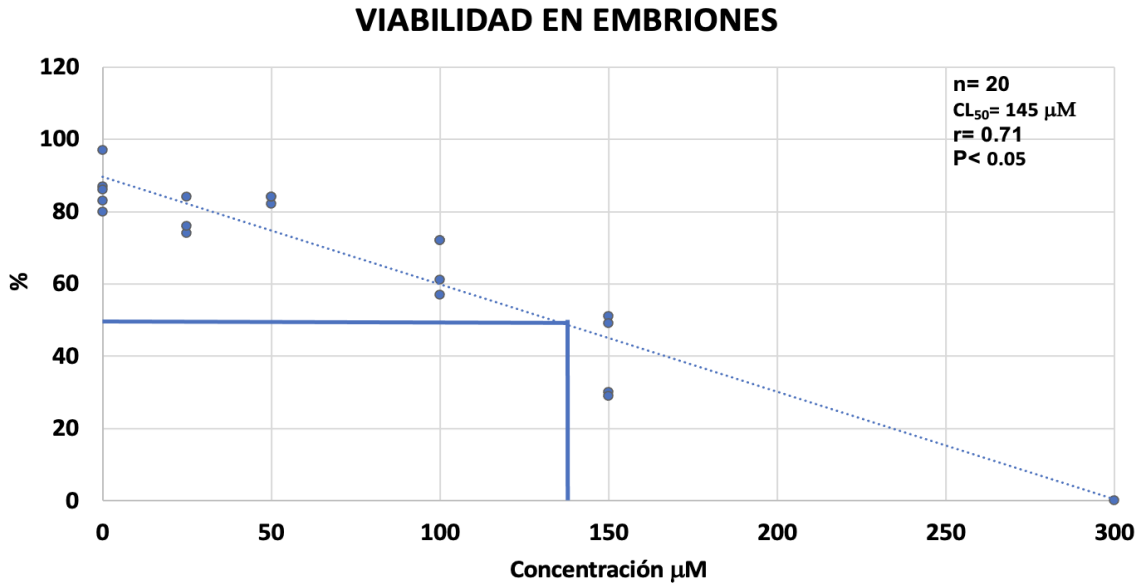
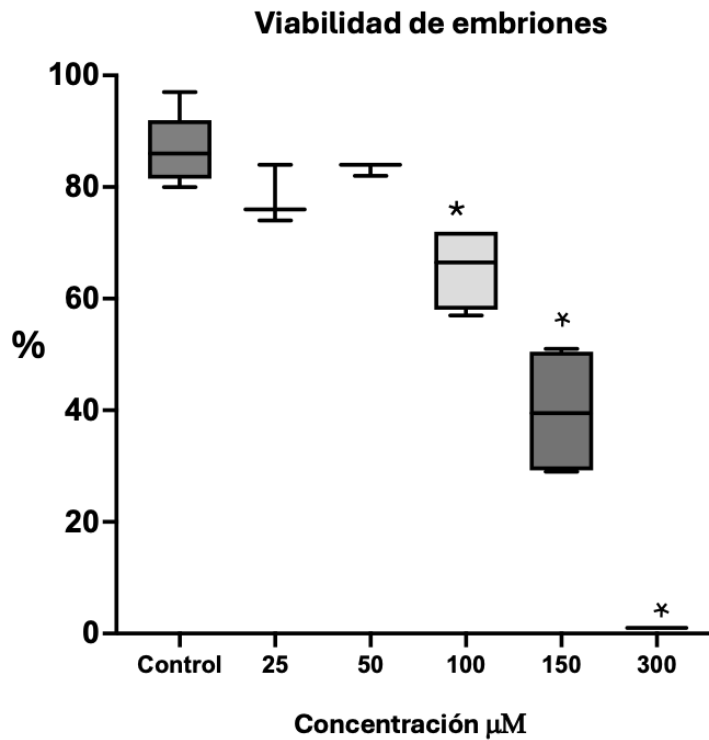


Figura 15. Viabilidad de embriones teñidos con Bromuro de tetrazolio (MTT) después de 144 h observados a 40X. En donde se muestra el descenso en la viabilidad de acuerdo con las concentraciones utilizadas Control, 25, 50, 100, 150 y 300 μM .

En la Gráfica 5 se muestran los resultados de viabilidad de los embriones a las 144 h de desarrollo, se puede observar una disminución concentración-dependiente. Después de la exposición al PrPB, el control tuvo un porcentaje de viabilidad cerca del 90%, en la concentración 25 μM el porcentaje de viabilidad se mantuvo alto cerca del 80%, al igual que en la concentración 50 μM , mientras que en concentración 100 μM se comienza a ver el descenso con un porcentaje cerca del 60%, en la concentración 150 μM a un 50% aproximadamente, en la concentración 300 μM la viabilidad llegó a 0%. Se estimó la CL_{50} que fue de 145 μM .



Gráfica 5. Efectos del PrPB en la viabilidad. n= número total de embriones evaluados, CL₅₀= concentración letal 50.



Gráfica 6. Efectos del PrPB en la viabilidad de embriones. * diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

Es importante mencionar que, tanto en el control como en las concentraciones, C25, y C50 μM se observa DE de buena calidad (Figuras 16,17 y 18). Sin embargo en las concentraciones 100, 150 y 300 μM hay diferencia estadísticamente significativa respecto al control (Grafica 6). En las concentraciones 100 y 150 μM el DE disminuyó significativamente, así como la calidad ya que se observa fragmentación de la cromatina y citoplasma retraído como se muestran en las Figuras 19 y 20. En la concentración 300 μM no hubo viabilidad ni DE (Figura 21).

En la Figura 16 se muestran varios embriones en desarrollo encontrados en el grupo control, en el **panel A** se aprecian embriones en campo claro observados mediante microscopio invertido, destaca un blastocisto eclosionando (Becls) ya que se puede ver el inicio de la ruptura de la zona pelúcida (flecha roja) y está se encuentra muy adelgazada, además que su tamaño destaca de los demás embriones en la misma imagen. El **panel B** muestra un blastocisto tardío teñido con Hoechst observado en un microscopio de fluorescencia, presenta gran cantidad de núcleos los cuales se aprecian uniformes. En el **panel C** se observa el mismo blastocisto teñido con MTT, se aprecia una coloración purpura lo que indica que se encontraba vivo a las 144 h de haber sido evaluado.

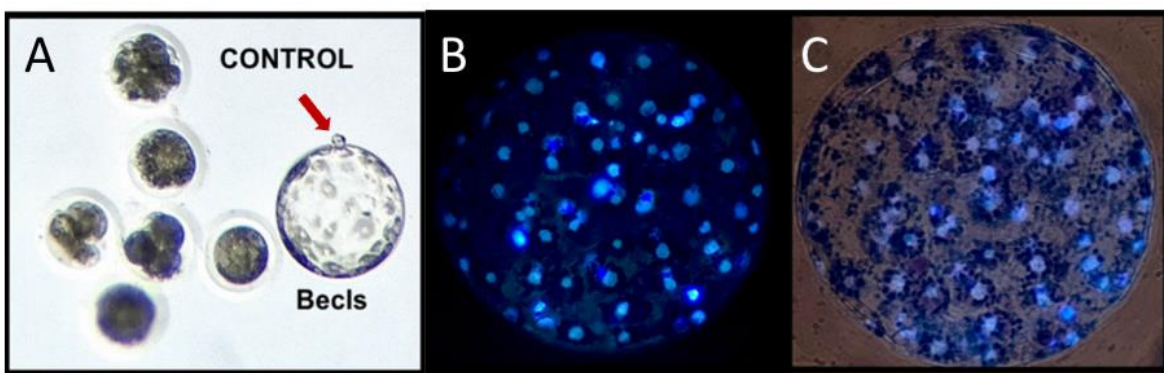


Figura 16. Embriones encontrados en grupo control, A blastocisto eclosionado en campo claro, **B** blastocisto tardío teñido con Hoechst, **C** blastocisto tardío teñido con MTT. Observados a 40X

En la Figura 17 se muestran embriones encontrados en la concentración 25 μM , el **panel A** muestra embriones en campo claro en etapa de mórula observados mediante microscopio invertido, los cuales se aprecian en buen estado por la uniformidad de los blastómeros y la zona pelúcida intacta. El **panel B** muestra una mórula teñida con Hoechst observada por microscopio de fluorescencia, se observan sus núcleos de distintos tamaños algunos en división (flecha roja). El **panel C** muestra la misma mórula además teñida con MTT, viva a las 144 h de DE y se puede observar la zona pelúcida en buen estado.

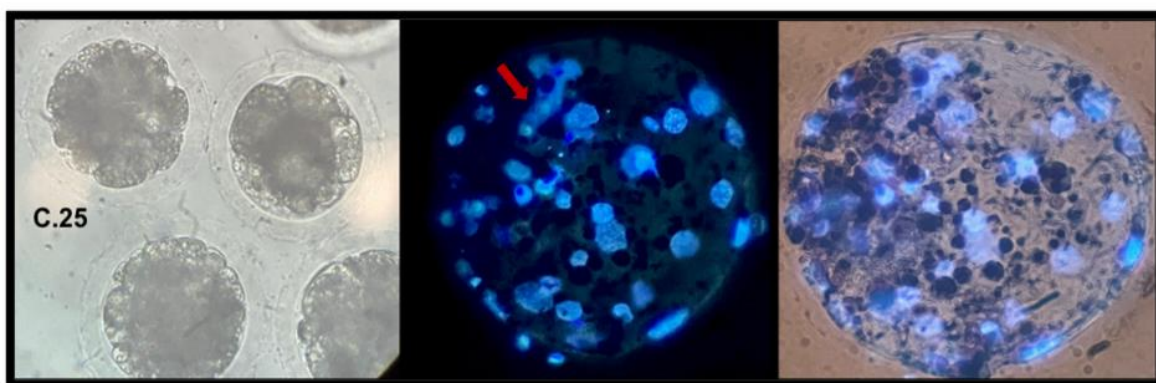


Figura 17. Embriones encontrados en la concentración 25 μM , A mórulas en campo claro, **B** mórula teñida con Hoechst, **C** mórula teñida con MTT. Observados a 40X

En la Figura 18 se observan embriones en varias etapas de desarrollo en la concentración 50 μM , en el **panel A** se observa un blastocisto temprano (Btemp) y dos tardíos (Btard) en campo claro con células uniformes del trofoblasto, el embrioblasto y zona pelúcida intacta. El **panel B** muestra un embrión en etapa blastocisto temprano, catalogado así por la cantidad de núcleos y el grosor de la zona pelúcida, teñido con Hoechst y observado mediante microscopio de fluorescencia, se aprecian núcleos uniformes y zona pelúcida en buen estado. En el **panel C** se aprecia una mórula teñida con MTT, por la coloración purpura que presenta se catalogó como vivo a las 144 h de DE.

Lo que demuestra que aún en esta concentración de PrPB hay DE de buena calidad, tomando en cuenta la velocidad de crecimiento del embrión ya que a las 144 h de DE en el modelo porcino deberíamos tener blastocistos y fue lo encontrado y pocas mórulas que muestra un DE lento, aunque en buen estado ya que los blastómeros presentaron uniformidad y no hubo fragmentos ni de la célula ni de sus núcleos.

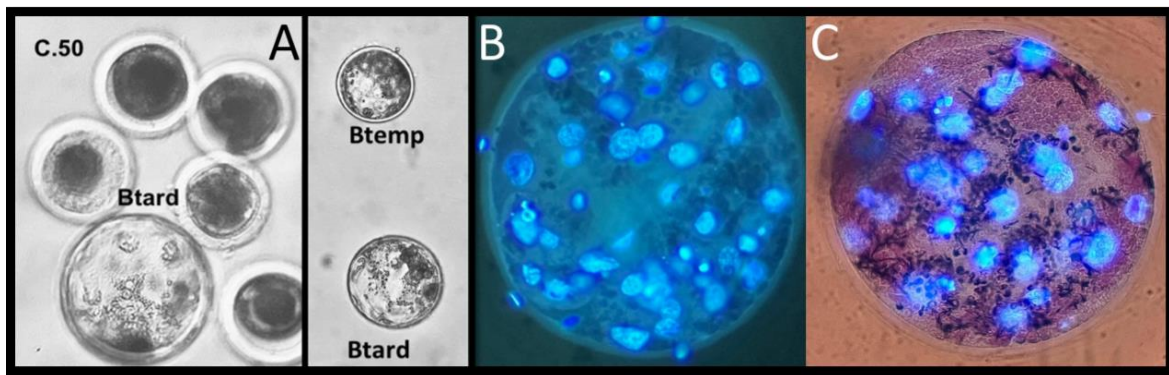


Figura 18. Embriones encontrados en la concentración 50 μ M, A blastocisto temprano (Btemp) y blastocisto tardío (Btard) observados en campo claro, **B** blastocisto temprano teñido con Hoechst, **C** mórula teñida con MTT. Observados a 40X

En la Figura 19 se muestran los tipos de embriones encontrados en la concentración 100 μ M. En **panel A** muestra una mórula cuyos blastómeros presentan fragmentos y no tienen uniformidad. En el **panel B** se observa un embrión con 6 blastómeros teñido con Hoechst, los núcleos no son uniformes y se comienzan a observar fragmentos de cromatina, uno de esos blastómeros no presenta núcleo (flecha roja). El **panel C** muestra el mismo embrión que el panel B doblemente teñido con MTT el color indica que se encontraba vivo después de las 144 h de DE, sin embargo, se aprecian blastómeros de distintos tamaños y un espacio anormal entre estos (flechas blancas).

Por el tiempo de incubación que tenían (144 h) a partir de esta concentración se catalogó como DE detenido ya que encontramos embriones con poca división que no con cuerda con el tiempo ni estado de DE esperado en el modelo porcino.

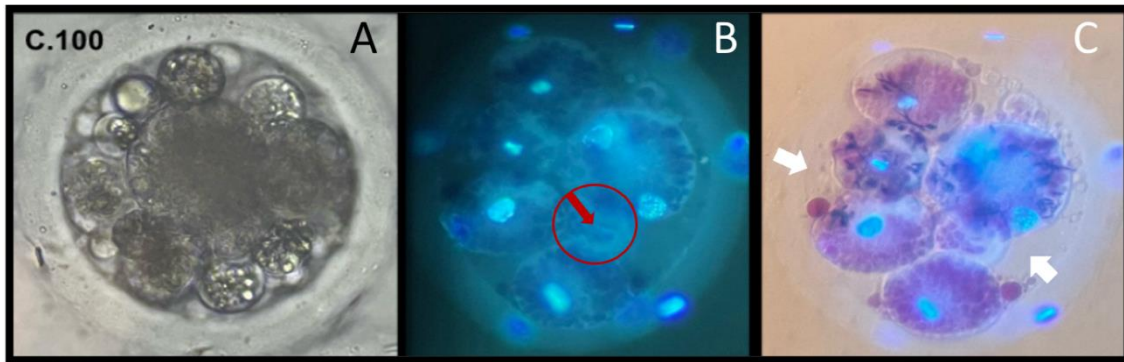


Figura 19. Embriones encontrados en la concentración 100 μM , A mórula con blastómeros fragmentados observada en campo claro, **B** embrión de 6 blastómeros teñido con Hoechst, uno de ellos no presenta núcleo. **C** embrión de 6 blastómeros teñido con MTT, se observan espacios anormales. Observados a 40X

En la Figura 20 se muestran embriones encontrados en la concentración 150 μM . En el **panel A** se observa un embrión en campo claro de dos blastómeros, estos no son uniformes. En el **panel B** un embrión de dos blastómeros teñido con Hoechst, los núcleos no son uniformes y presentan fragmentos de cromatina (flecha roja) también se aprecia un espacio que lo hace ver retraído. **Panel C**, el mismo embrión teñido con MTT se observan los blastómeros vivos, la zona pelúcida intacta, sin embargo, se ve con más claridad el espacio anormal en el embrión (flechas blancas).

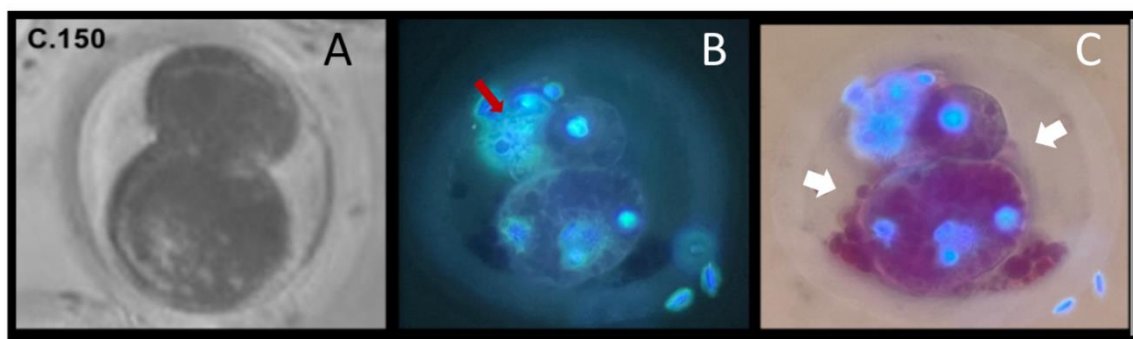


Figura 20. Embriones encontrados en la concentración 150 μM , A embrión de dos blastómeros observado en campo claro, **B** embrión de dos blastómeros teñido con Hoechst, se observan fragmentos de cromatina. **C** embrión de dos blastómeros teñido con MTT, se observan espacios anormales. Observados a 40X

En la Figura 21 se observan los ovocitos encontrados en la concentración 300 μM . **Panel A**, en campo claro, no se observa DE en ninguna etapa, solo se observan ovocitos cuyo citoplasma se encuentra retraído. **Panel B** muestra un ovocito de este grupo y se tiño con Hoechst, se aprecian gran cantidad de fragmentos de cromatina (flecha blanca) lo que indica que sí hubo fertilización, sin embargo, no se observan blastómeros.

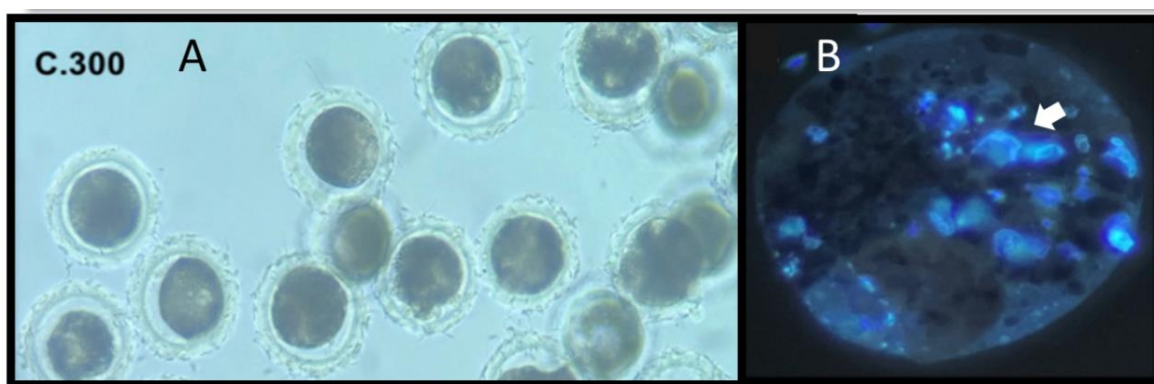
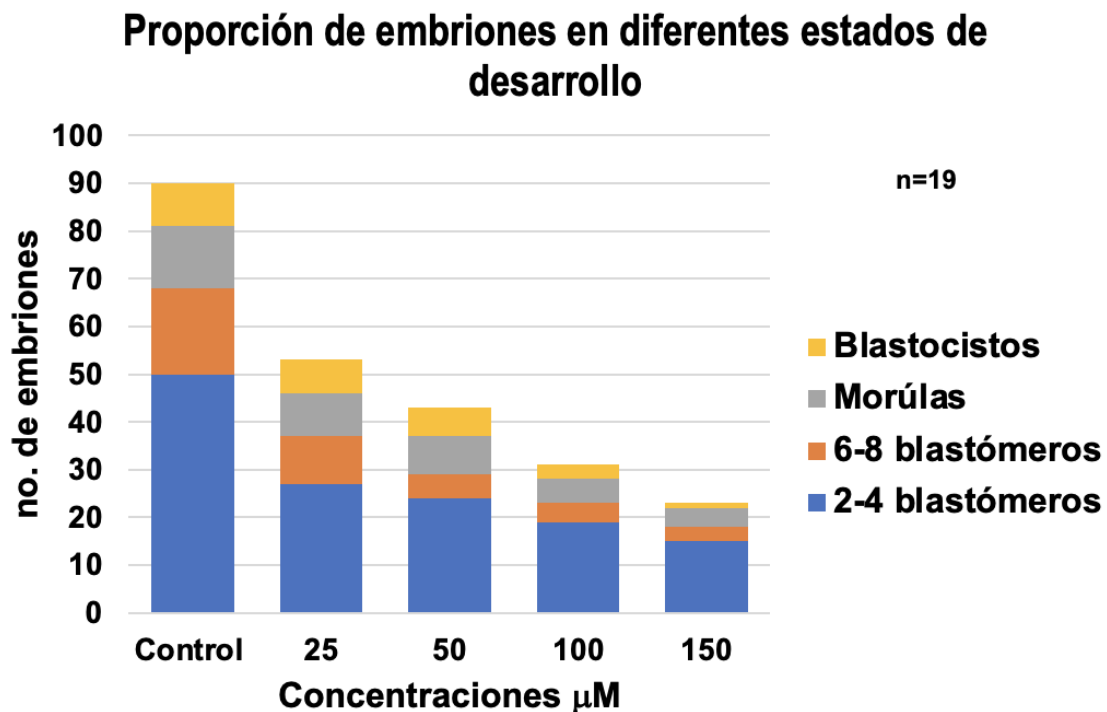
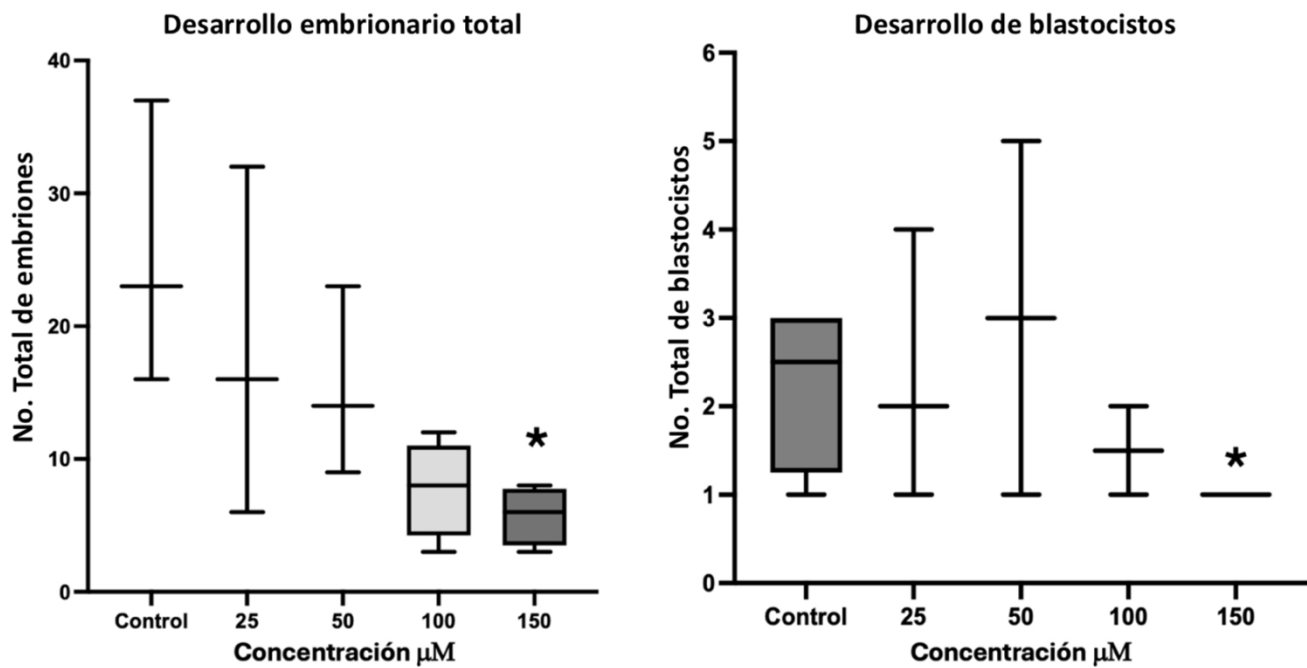


Figura 21. Ovocitos encontrados en la concentración 300 μM , A ovocitos retraídos en campo claro, **B** embrión teñido con Hoechst, no se aprecia la cantidad de blastómeros, se observan fragmentos de cromatina. Observados a 40X

Para la evaluación del DE a las 144 h post fertilización fue contabilizado el número total de embriones en división desde dos blastómeros hasta blastocisto tardío. Se realizaron 5 repeticiones con un total de 1000 embriones evaluados, estos fueron agrupados para su mejor observación de 2-4 blastómeros, de 6-8 blastómeros, Mórulas y Blastocistos, se presentó una relación concentración-dependiente a medida que aumenta la concentración que se asemeja a los resultados obtenidos en la viabilidad (Gráfica 5), en todas las concentraciones utilizadas tuvimos DE excepto en la concentración 300 μM sin embargo no todos de buena calidad.



Gráfica 7. Proporción de embriones en diferentes estados de desarrollo
n= número total de embriones evaluados.



Gráfica 8. Comparación número total de embriones/ número total de blastocistos. En ambas graficas se observa una diferencia estadísticamente significativa respecto al control en la concentración 150 μM (*).

10. Discusión

En la actualidad nos encontramos diariamente expuestos a una amplia variedad de productos de cuidado personal, estos no solo brindan confort sino también por su toxicidad, representan un peligro oculto para la salud reproductiva (Meng, *et al.*, 2020). Los PBs son utilizados ampliamente por sus efectos antibacterianos y fungicidas. En bacterias, interrumpen el sistema transportador de membrana e inhiben las ATPasas y fosfotransferasas, por lo que se usan en cosméticos, alimentos y productos de uso diario como desodorantes, cremas, lociones, etc. (Jeong, *et al.*, 2020).

En años recientes la literatura científica, ha informado que los PBs utilizados en cosméticos como maquillajes, podrían tener posibles efectos cancerígenos entre los que destacan el PrPB, MePB, BuPB y EtPB (Radoslaw, *et al.*, 2023). Otro estudio reciente indica que la exposición al BuPB se asocia con una disminución en el número de ovocitos en MII entre mujeres que asisten a clínicas de fertilidad, sugiriendo que la exposición puede tener un efecto adverso sobre el DE (Radwan, *et al.*, 2023). Se ha observado que la exposición a los PBs ha incrementado en los últimos años, sobre todo en mujeres a causa del uso constante de estos productos en su vida diaria (Soni., *et al.*, 2005). Aunque se ha informado sobre la toxicidad de los PBs, hay poca información disponible sobre los efectos en el DE.

En cuanto a la exposición de los PBs por diferentes vías de ingreso al organismo se ha reportado que la dosis personal diaria en promedio es de 76 mg (1.26 mg/kg pc/día), correspondiendo a 50 mg (0.833 mg/kg pc/día) a cosméticos y productos de cuidado personal, 25 mg (0.417 mg/kg pc/día) a los productos farmacéuticos, y alimentos estos representan aproximadamente 1 mg (10-13 mg/kg pc/día) (Soni., *et al.*, 2005). Del total de los 76 mg, 10 mg/kg pc/día corresponden únicamente al PrPB (Gal, 2019), por lo que se vuelve un tema que requiere más atención.

10.1 Alteraciones en la viabilidad y MIV

Los estudios *in vitro* son una herramienta importante para conocer los mecanismos de acción de los procesos biológicos con numerosas variables en ambientes controlados. Este es el primer estudio en demostrar que la exposición al PrPB a una concentración de 300 μM disminuye significativamente el proceso de viabilidad y MIV de forma concentración dependiente en ovocitos porcinos, así como el efecto en la proliferación y expansión de las células del cúmulo, que coincide con lo reportado en nuestro grupo de trabajo (Barajas-Salinas, *et al.*, 2020) utilizando MePB donde a concentraciones de 750 y 1000 μM se obtuvieron resultados similares. En el presente estudio la concentración letal 50 (CL_{50}) correspondió a 175 μM y la concentración de la inhibición de la maduración 50 (CIM_{50}) fue de 160 μM . Estos resultados muestran que el PrPB es aproximadamente 10 veces más tóxico en la viabilidad que el MePB ya que de acuerdo a los resultados obtenidos por Barajas, *et al.*, 2020 la CL_{50} fue de 2028.38 μM . En cuanto a la MIV, el PrPB es aproximadamente 5 veces más tóxico que el MePB (160 μM , 780.31 μM , respectivamente).

Estos efectos podrían atribuirse a la diferencia en la longitud de la cadena alquímica de los PBs, es decir, basándonos en su estructura, la longitud de esta determina en gran medida sus propiedades y usos. De tal manera que en cuanto más larga sea la cadena, el PB es menos soluble en agua y con mayor efecto antibacteriano y por tanto mayor potencial tóxico (De Lucas-Gill *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta esto, el MePB es considerado de los PBs de cadena corta con 1 carbón, mientras que el PrPB posee 3 carbonos por lo que a menor concentración el PrPB podría causar un efecto como el observado por Barajas-Salinas, *et al.*, 2020 en la disminución de la MIV.

En el caso de la viabilidad se ha propuesto el daño mitocondrial como posible mecanismo de acción causado por PBs ya que estos inducen estrés oxidante mediante el aumento en la producción de EROS (Meng *et al.*, 2020), en referencia

al estrés oxidante el cual es definido como el desequilibrio entre el sistema oxidante y el sistema antioxidante de la célula inducido por factores de estrés ambiental internos y externos, en general se sabe que es causado principalmente por radicales libres como el oxígeno reactivo y EROS como O_2^- (anión superóxido), OH^\cdot (Hidroxilo), RO_2^\cdot (peroxilo) etc. La cadena respiratoria de las mitocondrias es la principal fuente y objetivo de las EROS y a su vez, el estrés oxidante mitocondrial también afecta a la transmisión de señales redox a través de la membrana asociada al retículo endoplasmático (RE) para finalmente, las mitocondrias y el RE activen las vías de autofagia para contrarrestar el daño oxidante. La autofagia es el proceso en el que las células degradan las proteínas y dañan a los organelos a través de los liposomas, por lo que para promover el metabolismo celular y mantener un equilibrio interno estable, la autofagia es una vía importante para la regeneración celular, su inhibición conduce finalmente a la célula a la muerte por apoptosis (Xiaoqing, 2022).

En este estudio se realizó la técnica MTT que además de evaluar la viabilidad de las células expuestas al PrPB también permite determinar la actividad mitocondrial debido a su mecanismo de acción el cual consiste en la reducción metabólica del MTT a sales de formazán catalizada por la enzima succinato deshidrogenasa resultando en la coloración púrpura de las células cuya actividad mitocondrial es óptima (De Castro, 2006). En este estudio la viabilidad para el caso de la MIV se vio afectada en la concentración 300 μ M ya que fue de 15% con respecto al control.

En comparación con los resultados obtenidos Jeong, *et al.*, 2020 evaluaron el efecto del BuPB en la función y distribución mitocondrial usando la tinción Mito Tracker Deep Red, sus resultados muestran que a la concentración de 50 μ M de BuPB causó una distribución anormal de las mitocondrias y alteraciones del potencial de membrana durante la MIV, lo cual indica que las disfunciones mitocondriales afectan la producción de ATP dada por la fosforilación oxidativa, incapacidad para modular la producción excesiva de EROS y nitrógeno, la desregulación de calcio hasta la apertura del poro de transición de permeabilidad y el inicio de la apoptosis (Srinivasan, *et al.*, 2017).

Respecto a lo descrito anteriormente Yang, (2018) mencionó que la comunicación entre las mitocondrias y el RE tiene un papel importante ya que cuando las EROS causan estrés oxidante en el RE de la célula, daña los canales de Ca^{2+} . Por esto la sobrecarga de este catión en las mitocondrias afecta la producción de EROS en la cadena respiratoria, por lo que, para mantener la homeostasis, las mitocondrias inducen un aumento excesivo de la absorción Ca^{2+} lo que conduce a la célula a apoptosis.

Otro aspecto importante para la MIV es el glutatión el cual participa en varios procesos fisiológicos, entre los que destacan la transferencia de aminoácidos y la síntesis de proteínas, además de proteger a las células del estrés oxidante por sus efectos antioxidantes (Hashimoto, 2000). También se sabe que los niveles de glutatión en el ovocito reflejan la maduración citoplasmática (Yoshida, 1993), el cual es un proceso complejo que prepara al ovocito para la fertilización y DE, en este proceso se produce una redistribución de las mitocondrias a una posición perinuclear, que es necesaria para el progreso de la maduración, los gránulos corticales que están constituidos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas, se forman en el RE y complejo de golgi migrando hacia la periferia del ovocito, aumentan en número y se sitúan debajo de la membrana plasmática, después de la fertilización la exocitosis de las enzimas hidrolíticas de estos gránulos evita la entrada de espermatozoides adicionales constituyendo un bloqueo para la polispermia (Yanagimachi, 1994) por lo que de verse afectado todo este proceso se refleja en una MIV baja como el caso de este estudio.

10.2 Viabilidad y DE

Acerca del efecto en el DE, se conoce que la expansión de las células del cúmulo durante la maduración ocurre debido a la síntesis de ácido hialurónico producido por las células del cúmulo, las que a su vez producen su expansión. Sin embargo la

importancia de la producción de una matriz extracelular rica en proteoglicanos, como es el caso del ácido hialurónico, reside en promover la expansión de las células del cúmulo además de regular la comunicación entre estas y los ovocitos (Yokoo, 2010), participando en procesos como la maduración, la competencia de desarrollo del ovocito y el posterior DE, por lo tanto, es un indicador importante de la capacidad de maduración y fertilización de los ovocitos (Jeong, *et al.*, 2020) por lo que la MIV y el DE son dos procesos que van de la mano.

De acuerdo a lo observado durante la exposición de los embriones al PrPB se encontró una disminución significativa de la viabilidad en el DE dependiente de la concentración, lo que indica que se podría estar generando estrés oxidativo y con ello EROS que como se sabe se producen como un subproducto del metabolismo de la energía celular, por lo que la acumulación excesiva de estas puede inducir daño y conducir a las células a apoptosis, lo que se puede ver reflejado en un DE deteriorado en los embriones expuestos a las concentraciones más altas de PrPB como fue el caso de este estudio donde a partir de la concentración 100, 150 y 300 μM se observó una disminución en la viabilidad con respecto al control. Como ya se mencionó anteriormente las EROS también pueden alterar la organización mitocondrial, el potencial de membrana y la producción de ATP que son importantes para un adecuado DE (Hashimoto, 2000).

Otro estudio menciona que el BuPB tiene efectos tóxicos en las células del trofoblasto humano a través de la disfunción mitocondrial inducida por el estrés oxidante, aquí se reportó, por un lado, una disminución en los niveles de elementos antioxidantes no enzimáticos como son el glutatión, ácido úrico, ácido dihidrolipóico, metalotioneína, coenzima Q y melatonina y por otro los antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa y glutatión transferasa (Yang, 2018) por lo que el daño mitocondrial causado por PBs tiene aun más relevancia.

En cuanto a los resultados en el DE se sabe que la etapa temprana (de 2 a 8 blastómeros) es considerada la etapa más crítica, ya que son células totipotenciales,

estas cuentan con el potencial para diferenciarse en células embrionarias o extraembrionarias y con la capacidad para formar a un nuevo organismo por lo que son más susceptibles (Martin, 2017), a comparación de los ovocitos que estos cuentan con la protección de las células del cúmulo que lo rodean y son las primeras en estar en contacto directo con el tóxico. En cambio en el DE al no contar con células del cúmulo de “protección” el tóxico afecta directamente al embrión y de existir algún tipo de daño durante el DE debe ser reparado para así evitar la transmisión del defecto al nuevo organismo o de lo contrario llevar a la muerte celular que regularmente se da por apoptosis. En este trabajo se observó que los ovocitos tenían mayor resistencia al PrPB ya que la diferencia estadísticamente significativa fue a partir de 300 μM , mientras que en el DE el inicio del detenimiento se dio a partir de la concentración 100 μM a mayor concentración 150 y 300 μM hubo mayor muerte celular, evitando así la continuación del “daño” hasta la etapa de blastocisto.

Otra estructura importante en el DE es el citoesqueleto, formado por un complejo de estructuras constituidas por proteínas filamentosas presentes en la matriz citoplasmática de las células eucariotas como son los microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios (Suzuki, 2003). El citoesqueleto lleva a cabo la integridad estructural y funcional de las células, así como también el reordenamiento involucrado durante el DE temprano donde actúa como un sistema dinámico que dirige una serie de eventos tales como el establecimiento de la polaridad de los ovocitos y el anclaje del eje, así como la orientación, la migración y el desarrollo pronuclear del embrión, se sabe que la integridad del citoesqueleto es utilizado como parámetro para poder evaluar la calidad embrionaria (Bogliolo, 2015).

En este estudio no evaluamos calidad embrionaria, sin embargo, se observó daños significativos en embriones a concentraciones altas a partir de 100, 150 y 300 μM donde la división de los blastómeros se vio afectada, así como también el tiempo en la progresión del DE por lo que se propone existen daños en varias estructuras del embrión causadas por los efectos del PrPB.

Otras estructuras que se propone se dañan durante la exposición al PrPB son los microfilamentos los cuales son componentes constituidos por actina, la proteína citoesquelética más importante en la mayoría de las células, con un diámetro de 5 a 7 nm, están unidos a proteínas moduladoras, las cuales regulan la polimerización y despolarización en la célula, además interactúan con algunas otras proteínas en el citoplasma como la miosina que participa en procesos de movilidad celular y transporte (Benitez, *et al.*, 2003).

Se sabe que la miosina de tipo I está más relacionada al transporte celular, mientras que la miosina de tipo II participa en la formación del anillo contráctil que se forma durante la citocinesis (última etapa de la división celular), esta contracción del citoplasma tiene como finalidad estrechar su diámetro progresivamente hasta que se dé la separación completa de los dos citoplasmas de las células hijas (Benitez, *et al.*, 2003). Por lo que de verse afectada esta estructura, la división de las células hijas o blastómeros en el caso de este estudio se vería afectada ya que de acuerdo a lo observado a las 144 h de DE donde se esperaría encontrar embriones en etapa de blastocisto la mayoría de estos embriones se encontraban detenidos en etapas de 2–4 blastómeros y de 6–8 blastómeros, lo que indica, un retraso ó detenimiento de la progresión del DE, similar a lo observado en este estudio (Yang, 2018).

Incluso el PrPB podría estar produciendo daño en la polimerización de los microtúbulos del huso, estructuras tubulares de 25 nm diámetro constituidos por repeticiones de dímeros de α - y β - tubulina, estos participan en el transporte intracelular, en el movimiento de cilios y flagelos así como en la construcción del huso para la segregación de cromosomas y el desplazamiento de centriolos durante la mitosis (Benitez, *et al.*, 2003). Así mismo, los microfilamentos de actina que podrían también verse afectados, por lo que provocarían un retraso en la división de blastómeros y por lo tanto la muerte celular.

Otro aspecto muy importante es el daño causado al ADN por los PBs, se sabe que la cromatina está formada por ADN y proteínas, principalmente histonas (proteínas ricas en arginina y lisina). La unidad básica estructural de la cromatina son los nucleosomas, estos complejos se repiten cada 200 pares de bases formando fibras de cromatina las cuales tienen apariencia de collar de cuentas, los cambios en la modificación de las histonas se ha descrito que retrasan la reanudación meiótica y alteran la condensación de la cromatina, así como también la activación o inhibición de genes (Meng, *et al.*, 2020). Estos datos podrían ayudar a entender por qué se observan fragmentos de cromatina en los embriones expuestos a las concentraciones más altas de PrPB como en este estudio en la concentración 300 μM donde la integridad de la cromatina se ve afectada. Adicional a esto JH, Martín. *et al.*, 2016 menciona que la reparación del ADN en el desarrollo temprano puede resultar en un paro embrionario completo o un desarrollo deficiente por lo que refuerza lo observado en este trabajo.

Por último, la transmisión de defectos en el embrión tiende a la replicación, ya que el ciclo celular de embriones tempranos consiste en la alternancia de fases S y M con puntos de restricción breves, por lo que el daño al ADN se replica rápidamente. De lograr el DE temprano pasar esta etapa, el embrión tiene más posibilidad de culminar su desarrollo hasta la etapa de blastocisto (Martin, 2017), esto se relaciona con nuestro estudio donde a pesar de tener DE en concentraciones altas de PrPB (100, 150 y 300 μM) estos embriones fueron catalogados de mala calidad ya que se observaron blastómeros anucleados, y fragmentación de cromatina por lo que se infiere que estos embriones no lograron contrarrestar el daño provocado por el PrPB y la mayoría de estos se encontraron muertos y detenidos en el DE.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio y lo reportado por otros autores referente a los PBs nos permite proponer un posible mecanismo de acción por el cual el PrPB provoca disminución en la viabilidad de ovocitos así como también en el DE además de la disminución de la MIV y el progreso del DE. Dicho mecanismo de acción se muestra en la Figura 22.

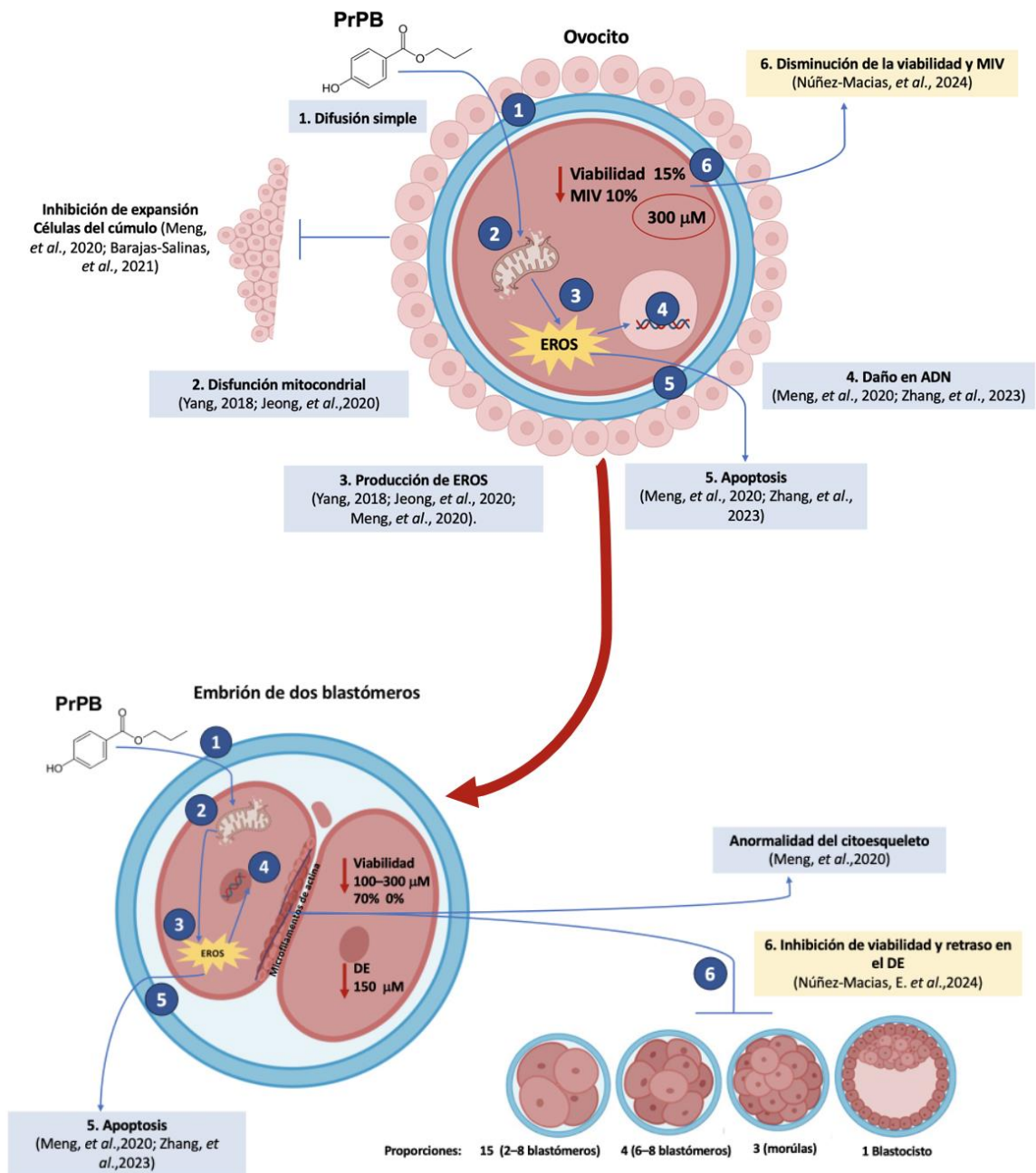


Figura 22. Posible mecanismo de acción propuesto del PrPB en ovocitos y DE porcino. La exposición del PrPB durante la MIV y DE podría causar daño en las mitocondrias generando EROS en el ovocito y en el embrión, desencadenando apoptosis, también afectaciones en los microfilamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios provocando anomalías en el citoesqueleto y la disminución en la expansión de las células del cúmulo como en la viabilidad de ovocitos y embriones porcinos. Además daños al ADN mediante metilación, fragmentación en la cromatina o la inhibición de genes importantes para el DE. Modificado de Meng, et al., 2020; Jeong, et al., 2020; Yang, 2018; Zhang, et al., 2023.

En la Figura 22 se muestra el posible mecanismo de acción propuesto mediante el cual el PrPB afecta la viabilidad, MIV y el DE en el modelo porcino, tanto en el ovocito como en el embrión el primer paso consiste en la entrada del PrPB a la célula mediante difusión simple, esto debido a la capacidad que tiene de atravesar la membrana plasmática de las células debido a su estructura y tamaño, en el ovocito lo primero que se encuentra son las células del cúmulo las cuales proveen protección al ovocito y es por esto que se infiere que debido a eso la concentración de disminución de viabilidad y MIV es mayor (300 μM) a la del DE donde a concentraciones de (100, 150 y 300 μM) el PrPB comienza a ejercer daño en el embrión, una vez dentro de la célula ejerce acción en las mitocondrias provocando la distribución anormal y defectos en la permeabilidad de estas, lo que provoca la producción e incremento en las EROS debido a la falla en la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Esta falla en las mitocondrias desencadena estrés oxidante tanto en el ovocito como en el embrión que se refleja en el daño al ADN provocando alteraciones en la cromatina del ovocito, en el embrión con daños en citoesqueleto y microfilamentos de actina. Si la célula logra contrarrestar el daño provocado continuará con la MIV o el DE sino se programará a apoptosis, lo cual se ve reflejado en el ovocito con la disminución de la viabilidad y MIV, en el embrión con la viabilidad y retraso en el DE. Los hallazgos encontrados en este estudio se muestran de color amarillo.

11. Conclusión

La exposición de los ovocitos al PrPB durante la MIV disminuyó significativamente la viabilidad de forma concentración dependiente así como también la maduración a partir de 300 mM. En embriones, el PrPB provocó un descenso en la viabilidad de manera concentración dependiente en correlación con el aumento en la concentración. Los embriones que estuvieron expuestos a altas concentraciones de PrPB (100, 150 y 300 μM) mostraron un retraso o suspensión del desarrollo temprano y aquellos que se vieron más afectados no lograron contrarrestar el daño para continuar con el desarrollo por lo que se infiere que se programaron a

apoptosis. Es importante destacar que el PrPB es aproximadamente diez veces más tóxico que el MePB en la viabilidad y cinco veces más tóxico en la MIV. Lo anterior es debido a la longitud de la cadena alquílica, ya que se pudo comparar con resultados anteriormente obtenidos en nuestro grupo de trabajo y con lo publicado en la bibliografía consultada.

Estos resultados aportan evidencia de que el PrPB afecta la salud reproductiva femenina disminuyendo la maduración del ovocito así como también retrasa el DE temprano, por lo que se requieren más estudios que profundicen acerca del daño provocado, debido al uso constante de productos que contienen PBs.

12. Perspectivas

Con los resultados del presente estudio se propone continuar con este proyecto para determinar los posibles mecanismos que producen el daño observado en este trabajo.

Se abordará la producción de EROS como posible causa del retardo en el DE. Determinar la distribución de la actina en el citoesqueleto y daño a nivel de los cromosomas durante la meiosis.

Para llevar a cabo este efecto se propone usar concentraciones subletales de los PBs.

13. Bibliografía

1. Ahn, H. (2012). Parabens inhibit the early phase of folliculogenesis and steroidogenesis in the ovaries of neonatal rats. *Mol Reprod Develop*, 79 (9), 626-636.
2. Aritro, S. (2013). Oocyte Maturation: A story of arrest and release. *Front in Bioscience*, 5, 451-477.
3. Arteaga, M. García, P. (2017). *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. Ciudad de México : EDITORIAL MEDICA panamericana 2da edición. Pág. 90-110
4. Barajas-Salinas, A. (2020). *Efecto del metil-parabeno durante la maduración in vitro de ovocitos de cerdo. Tesis de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal*. México, Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
5. Barajas-Salinas, A. Ducolomb, Y. Betancourt, M. Núñez-Macías, E. López, A. Barraza, J. Casillas, F. (2021). Effects of methylparaben on in vitro maturation of porcine oocytes. *J. Appl Toxicol In Vitro*, 41: 330-337.
6. Benitez, G. González, A. Meza, I. (2003). El citoesqueleto. En *Biología celular y molecular* (eds Jimenez y Merchant). 1era ed. Pearson Education México, 273-292.
7. Bogliolo, L. M. (2015). Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 32: 185-193.
8. Bonilla, M. (2009). *Reproducción Asistida. Abordaje en la práctica clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. 18-22.
9. Calafat, A. Ye, X. Wong, L. Bishop, A. Needham, L. (2010). Urinary concentrations of four parabens in the U.S population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect*. 118: 679-85.
10. Carlson, B. (2019). *Hum Embryol Develop Biol*. 6th edición ELSEVIER. págs 521. Barcelona, España.

11. 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. *Appl Toxicol In Vitro*. 24: 224-230.
12. Casillas, F. (2014). Efecto de las células del cúmulo en la viabilidad, maduración, fertilización y desarrollo embrionario después de la vitrificación de ovocitos inmaduros porcinos in vitro. Tesis de la Maestría de Biología de la Reproducción Animal. México, Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
13. Dabre, P. Byford, J. Shaw, L. Hall, S. Coldham, N. Pope, G. Sauer, M. (2004). Oestrogenic activity of benzylparaben . *J. Appl. Toxicol*, 23: 43-51.
14. De Castro, C. (01 diciembre 2006). Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the MTT test. Recuperado el 12 de enero de 2024, de https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf.
15. De Lucas-Gill, E. Rubio-Marcos, F. Leret, P. Motos-Perez, B. Monte-Serrano, M. Menendez, J. Fernandez, J. F. (2017). Opening a new gate to glass preservative with long-lasting antimicrobial activity as replacement of parabens. *ACS Sustainable Chemistry & Energy*. 5(1), 294-302.
16. Dodge, L. Kelley, K. Williams, P. Williams, M. Hernández-Díaz, S. Missmer, S. Hauser, R. (2015). Medications as a source of paraben exposure. *Reprod Toxicol*, 52:93-100.
17. Ducolomb, Y. Casas, E. Romo, S. Bonilla, E. (2012). La fertilización in vitro y sus aplicaciones en producción animal y en investigación básica . *Avances en Biología de la Reproducción*. 40: 83-106.
18. Ducolomb, Y. Romo, S. Balcázar, J. Rodarte, L. Casas, E. Del Carmen, G. Sciutto, E. Betancourt, M. (2005). Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos in vitro. *Tec Pecu Méx*. 43 (3): 425-432.
19. Gal, A. (2019). Propylparaben inhibits mouse cultured antral follicle growth, alters steroidogenesis, and upregulates levels of cell-cycle and apoptosis regulators . *Reprod Toxicol*, 89: 100-106.

20. Giulivo, Y. Lopez de Alda, M. Capri, E. Barceló, D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. *Environ Res*, 151: 251-264.
21. Guo, Y. Kannan, K. (2013). A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ Sci Technol*, 47:14442-14449.
22. Gupta, R-C. (2011). Organophosphate and carbamate pesticides. *In Reprod Develop Toxicol*. 84: 471-486.
23. Haman, C. Dauchy, X. Rosin, C. Munoz, J. (2015). Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. *Water Research*, 68: 1-11.
24. Hashimoto, S-M. (2000). Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev*. 57: 353-360.
25. Janjua, N. Frederiksen, H. Skakkebaek, N. Wulf, H. Anderson, A. (2008). Urinary excretion of phtalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans . *Int J Androl*, 31: 118-130.
26. Jeong, P. Lee, S. Park, S. Kim, M. Kang, H. Nanjidsuren, T. Kim, S. (2020). Butylparaben is toxic to porcine oocyte maduration and subsequent embryonic development following in vitro fertilization. *Int J Mol Sci*, 21:3692-3705
27. JH, Martín. Bromfield, EG Aitken, RJ. Nixon, B. (2016). Biochemical alterations in the oocyte in support of early embryonic development. *Cell. Mol.Life Sci*. 74 (3): 469-485.
28. Jimenez-Díaz, I. Vela-Soria, F. Zafra-Gómez, A. Navalon, A. Ballesteros, O. Navea, N. Vílchez, J. (2011). A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of parabens in human placental tissue samples. *Talanta*, 84: 702-709.
29. Jurewicz, J. Radwan, M. Wielgomas, B. Dziewirska, E. Karwacka, A. Klimowska, A. Hanke, W. (2017). Human semen quality, sperm DNA damage, and the level of reproductive hormones in relation to urinary concentrations of parabens. *J Occup Environ Med*. 59: 1034-1040.

30. Liao, C. Chen, L. Kannan, K. (2013). Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure . *Environ* , 58: 68-74.
31. Liao, C. Kannan, K. (2014). Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. *Sci. Total Environ* , 475: 8-15.
32. Llobat, L. (2021). Pluripotency and Growth Factors in Early Embryonic Development of Mammals: A comparative approach. *Vet Sci*, 16.
33. López- Serna, N. (2011). Biología del desarrollo. *Mc Graw Hill*, 1st edición. México. Pag 15-27.
34. Lorenzen, E. Follmann, F. Jungersen, G. Agerholm, J. (2015). A review of the human vs porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection . *Vet Res*, 46: 116-129.
35. Martin, J. B. (2017). Biochemical alterations in the oocyte in support of early embryonic development. *Cell Mol Life Sci.*, 74: 469-485.
36. Martínez-Saenz, E. Moreno, E. Muñoz-Ramírez, J. Trolice, M.P. Barranquero-Gomez, M. Salvador, Z. (13 junio 2023) Calidad Embrionaria para transferencia o congelación de embriones. Reproducción asistida ORG. Recuperado el 20 enero de 2024 de www.reproducciónasistida.org
37. Meng, F. Jiao, X. Chen, F. Zhang, X. Duan, Z. Ding, Z. Huo, L. (2020). Isobutylparaben negatively affects porcine oocyte maturation through increasing oxidative stress and cytoskeletal abnormalities. *Environ Mol Mut*, 61: 433-444.
38. Mi-Yeong, S. (2019). Pharmacokinetic profile of propyl paraben in humans after oral administration. *Environ Internat*. 130: 104917-104926.
39. Mínguez-Alarcón, L. Chiu, Y. Messerlian, C. Williams, P. Sabatini, M. Toth, T. Hauser, R. (2016). Urinary paraben concentrations and in vitro fertilization outcomes among women from a fertility clinic. *Fertil Steril. EARTH Study Team*, 105: 714-721.
40. Morales, J. (2020). *Fundamentos de Embriología Veterinaria*. Córdoba, España. Ediciones DON FOLIO. 554: 21-57

41. Núñez-Macías, E. (2019). Efecto del propilparabeno en la maduración in vitro de ovocitos porcinos. Servicio social de la Licenciatura en Biología Experimental . *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa*.
42. Núñez, L. Tadeo, J. García-Valcárcel, A. Turiel, E. (2008). Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromat, A*. 1214: 178-182.
43. Ortiz, R. Acevedo, B. (2010). Reproducción Asistida y salud infantil. *Pediatría y Atención Primaria* , 12: 651-671.
44. Pan, B. (2019). The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reprod Biol Endocrinol*, 17: 8-21.
45. Quezadas-Fuentes, J. (2021). Los Parabenos y sus efectos en la reproducción femenina. *Tesis de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa*.
46. Radoslaw, B. Pawel, B. Jasńska-Balwierz, A. Siodlak, D. Kusakiewicz-Dawid, A. Kurek-Górecka, A. Olczyk, P. Ochedzan-Siodlak, W. (2023). Potencial Carcinogens in Makeup Cosmetics. *Int J Environ Res Public Health*, 20: 6901-6904.
47. Radwan, P. Wielgomas, B. Radwan, M. Krasínki, R. Bujak-Pietrek, S. Polanska, K. Kilanowicz, A. Jurewicz, J. (2023). Urinary concentration of selected nonpersistent endocrine disrupting chemicals reproductive outcomes among women from a fertility clinic . *Environ Sci Pollut Res Int.*, 30: 45088-45096.
48. Rodriguez, J. (2019, septiembre 4). *Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza*. Retrieved from Toxicología Reproductiva : www.zaragoza.unam.mx
49. Rossant J, T. Patrick, P. (2022). Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. *Dev Cell*. 57: 152-165.
50. Sadler, T. Langman, W. (2012). *Embriología médica*. Barcelona, España: Lippincott/ Williams & Wilkins. 335-389
51. Santos, R. Schoevers, E. R. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reprod Biol Endocrinol* , 26: 112-117.

52. SEF Sociedad Española de Fertilidad. (2011). *Saber más sobre Fertilidad y Reproducción Asistida*. Madrid, España: MSH impresiones.
53. Senger, PL. (2005). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions Inc., Washington.
54. Serna, N. (2012). *Biología del Desarrollo*. México: 3era edición Mc Graw Hill.48-60
55. Shin, M. Choi, J. Lee, J. Kim, S. (2019). Pharmacokinetic profile of propyl paraben in humans after oral administration. *Environ Int.* 130: 104917-104925
56. Siu, K. (2021). The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion . *J Cell Biol*, 220: 10-15.
57. Smarr, M. Sundaram, R. Honda, M. Kannan, K. Louis, G. (2017). Urinary concentrations of parabens and other antimicrobial chemicals and association with couples fecundity . *Environ Health Perspect* , 125: 730-736.
58. Soni, MG. Carabin, IG. Burdock, GA. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol.* 43: 985-1015.
59. Srinivasan, S. Guha, M. Kashina, A. Avadhani, N. (2017). Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics- The cancer connection. *BioMed Res Internat*, 1858 (8).
60. Suzuki, H. S. (2003). In Vitro fertilization and polyspermy in the pig: factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. *Microscopy Research and Technique* , 61: 327-334.
61. Teteltitla, M. (2014). Evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcinos expuestos a sulfonato de perfluorooctano (PFOS) in vitro. Tesis de maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
62. Turathum, B. (2021). The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization . *Cells*, 10: 2292-2307
63. Vela-Soria, F. Rodríguez, I. Ballesteros, O. Zafra-Gómez, A. Ballesteros, L. Cela, Navalón, A. (2014). Simplified matrix solid phase dispersion procedure for the determination of parabens and benzophenone-ultraviolet filters in human placental tissue samples. *J Chromat*, 1371: 39-47.

64. Vo, T. Yoo, Y. Choi, K. Jeung, E. (2010). Potencial estrogenic effects of parabens at the prepuberal stage of a postnatal female rat model. *Reprod Toxicol*, 29: 306-316.
65. Xiaoqing, LR. (2022). Mitochondrial-endoplasmic reticulum comunication mediated oxidative stress and autophagy. *BioMed Res Internat*. 2022: 12-24
66. Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. *En: Knobil E, Neill JD (eds), The Physiology of Reproduction, 2da ed. New York: Raven Press*, 189-316.
67. Yang, CL. (2018). Butyl paraben promotes apoptosis in human trophoblast cells through increased oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress. *Environ. Toxicol*. 33: 436-445.
68. Yokoo, M. K. (2010). Introduction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *J Reprod Develop*. 56:15-19.
69. Yoshida, M. (1993). Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol. Reprod. Dev*. 35: 76-81.
70. Zhang, Z. Sun, L. Hu, Y. Jiao, J. Hu, J. (2013). Inverse antagonist activities of parabens on human oestrogen-related receptor γ (ERR γ): in vitro and in silico Studies. *Toxicol Appl Pharmacol*, 270: 16-22

14. Anexos

TÉCNICA DE MADURACIÓN IN VITRO (MIV)

DÍA I por la mañana

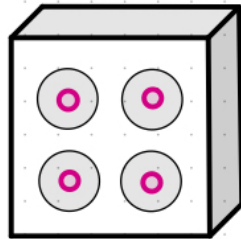
1. Atempere la solución salina a 25°C (temperatura ambiente)
2. Retirar el TL-HEPES de refrigeración e incubarlo a 38.5 °C para que se atempere de forma gradual

NOTA: todas la incubaciones serán a esta temperatura.

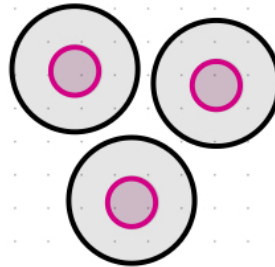
Suplemento de TCM-199, el día de la MIV:

1. Tomar 9.5 mL de TCM-199 previamente preparado (está en refrigeración) y agregarlo en un tubo de 15 mL.
2. Tomar 2.5 mL de TCM-199 y agregarlo en un tubo 5 mL.
3. Pesar 0.0033 g de cisteína y agregarlos a los 2.5 mL del tubo chico (5 mL), para homogenizar mezclarlo suavemente.
4. Tomar 0.5 mL del tubo chico que contiene la cisteína y agregarlo al tubo de 9.5 mL de TCM-199 para completar los 10 mL.
5. A los 10 mL del medio, agregarle 100 µL de EGF ("Epidermal Growth Factor").
6. Filtrar en un tubo de 15 mL estéril (Filtro 0.22 µm).
7. Preparar 3 cajas de Petri (3 cm) y 1 caja de 4 pozos.
8. Etiquetar e incubar con tapa NO CERRADA, tanto los tubos donde se suplementó el medio TCM-199 como las cajas (para permitir la entrada de CO₂ y se calibre el pH) al menos 3 h.
9. Después de la punción ovárica se colectarán al rededor de 50 complejos ovocitos células del cúmulo (COCs) por pozo y se dejan madurar por 44 h se incuban en atmósfera de CO₂ (5%).
10. A los pozos con COCs se les agregan 20 µL de FSH/LH

Cajas de 4 pozos
INCUBACIÓN



Cajas Petri
LAVADOS



500 µL de TCM-199 suplementado y se cubren con
aceite mineral.

Biól. Exp. Jessica Elivier Núñez Macías

PUNCIÓN FOLICULAR Y COLECTA DE COCs

DÍA 1 por la mañana

1. A la llegada del rastro, los ovarios se lavan con solución salina al 0.9% atemperada y se colocan en un vaso de precipitado (con solución salina tibia).
2. Ordenar el espacio de trabajo, campana de flujo laminar encendida con esterilidad, mesa cubierta con papel Kraft.
3. A una jeringa de 10 mL hacerle 2 orificios, uno a la altura en 1 mL y el otro en 10 mL y colocar la aguja rosa de 1,2x40 mm para la punción, con el bisel hacia arriba.
4. Puncionar los folículos de 3 a 5 mm diámetro y coleccionar el fluido folicular en un tubo de 50 mL.
5. Dejar sedimentar por 20 min el fluido folicular con los complejos ovocitos células del cúmulo (COCs).
6. Quitar el sobrenadante hasta dejar únicamente el paquete celular (aproximadamente a 5 mL).
7. Agregar TL-HEPES hasta 20 mL y dejar sedimentar por otros 15 min.
8. Nuevamente quitar sobrenadante hasta 5 mL y llevarlo a 20 mL con TL-HEPES, dejar sedimentar por 15 min más.
9. Quitar el fluido folicular hasta 5 mL.
10. Agregar 20 mL de TL-HEPES al tubo de 50 mL y dividir la muestra en 2 partes para verterlos en una caja petri de 90 mm de diámetro (Ocupar tapa y base de la caja).
11. Seleccionar ovocitos con citoplasma uniforme y por lo menos tres capas de granulosas, pasarlos por las tres cajas de lavado para retirar exceso de granulosas.
12. Depositar de 50-60 ovocitos por pozo en la caja para la incubación (caja de 4 pozos).
13. Agregar a cada pozo con ovocitos, 25 μ L de hormona FSH/LH 75 UI.
14. Dejar a incubación por 44 h para la maduración.

RETIRO DE CULTIVO DE MIV

DÍA 3 (MEDIO DÍA APROX).

1. Retirar las granulosas de los COCs por medio de acción mecánica con ayuda de una micropipeta de 100 μ L.
2. Retirar los ovocitos del medio de MIV (TCM-199).
3. Realizar 3 lavados con (PBS+BSA ó TBM) según el procedimiento que se realice en seguida, ya sea para evaluar MIV o realizar FIV con ayuda de una pipeta de 100 μ L.
4. Realizar el procedimiento correspondiente según la técnica a emplear.

SOLUCIÓN SALINA: Para transportar ovarios.

NaCl 9.2 g por litro de agua destilada, calentar a 36/38 °C para el transporte al rastro.

TL-HEPES: Lavado de ovocitos después de puncionar los ovarios.

	1 litro	500 mL	250 mL		1 litro	500 mL	250 mL
NaCl	6.6633	3.33165	1.665	Sorbitol	2.186	1.093	0.545
KCl	0.2386	0.1193	0.059	NaHCO ₃	0.168	0.084	0.042
NaH ₂ PO ₄	0.0408	0.0204	0.0102	Gentamicina	0.0250	0.0125	0.0062
Lactato de Na	1.4 mL	0.7 mL	0.35 mL	Penicilina G	0.065	0.0325	0.01625
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1017	0.05085	0.025	PVA	0.1	0.050	0.025
HEPES	2.383	1.1915	0.5957	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.294	0.147	0.0735
Piruvato de Na	0.022	0.011	0.0055				

1. Tomar 500 mL de agua mili-Q (medir con la probeta, poner la mitad en un vaso de precipitado para agregar las sales.
2. Ajustar pH entre 7.2-7.4
3. Aforar a 500 mL
4. Filtrar (poro de 0.45 μL)

Nota: Filtrar cada semana, dura 3 semanas en refrigeración.

TCM-199 (Tissue culture medium): medio de maduración de ovocitos.

	100 mL	50 mL
PVA	0.1 g	0.05 g
D-Glucosa	0.05496 g	0.02748 g
Ac. Pirúvico	0.01g/8 μL	0.005 g/4 μL
Estreptomicina	5 mg	0.0025 g
Penicilina	7.5 mg	0.00375 g

1. Tomar la mitad del medio TCM-199, agregar en un vaso de precipitado y agregar las sales.
2. Aforar
3. Filtrar
4. Guardar a 4 °C (refrigerador).
5. Suplementar el día de la colecta de ovarios para hacer cajas para la MIV.

TBM (Tris buffer medium): Lavado de ovocitos antes de la fertilización, después de retirar las células de la granulosa.

Medio de fertilización; capacitación espermática.

	g/200 mL	g/100 mL	g/50 mL
NaCl	1.32	0.6611	0.3305
KCl	0.0448	0.0224	0.0112
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2204	0.1102	0.0551
Tris (base libre)	0.4846	0.2423	0.12115
Glucosa	0.3964	0.1982	0.0991
Piruvato de Na	0.11	0.055	0.0275

1. Tomar la cantidad deseada a preparar de agua mili-Q con una probeta, colocar la mitad en un vaso de precipitado y agregar las sales.

2. Aforar

3. Refrigerar

Nota: No ajustar pH, se suplementa 48 h antes de la FIV de la siguiente manera:

Suplemento de TBM

Para semen fresco:

TBM	20 mL
BSA 7888.	0.08 g
Benzoato de cafeína	0.02 g

Para semen congelado:

TBM.	20 mL
BSA 7888.	0.02 g
Benzoato de cafeína.	0.008 g

1. Tomar 20 mL de TBM

2. Agregar las cantidades de BSA y cafeína

3. Tapar el tubo con papel aluminio perforado e incubar a 38°C por 24 h

4. Posterior a las 24 h se filtra el medio, se preparan las cajas de FIV y el restante se guarda en tubos de

5 mL tapados con papel aluminio perforado en la incubadora hasta su uso.

DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline) : Para lavado de espermatozoides

Tomar 250 mL de DPBS comercial del refrigerador (4 °C) y agregar:

	250 mL.	125 mL.
CaCl ₂ anhidro	0.0250 g	0.0125 g
Penicilina	0.025 g	0.0125 g
Estreptomicina	0.01875 g	0.009375 g

1. Filtrar (0.45 µL)

2. Guardar a 4 °C

Biol. Exp. Jessica Elivier Núñez Macías

Suplemento de DPBS: el mismo día de FIV por la mañana.

1. Tomar 50 mL de DPBS preparado y agregar 0.05 g de albúmina sérica bovina (BSA 8022)
2. Ajustar pH 7.2-7.4 (de preferencia 7.2)
3. Filtrar
4. Guardar en la incubadora tapado y sellado con parafilm para evitar la entrada de CO₂
5. Después de 30 min, se divide el medio en 2 jeringas de 10 mL, 10 mL en cada una y se meten a la incubadora.

NCSU-BSA free 23 (North Carolina State University): medio de desarrollo embrionario

	g/100 mL	g/50 mL
NaCl	0.6355	0.31775
KCl	0.0356	0.0178
KH ₂ PO ₄	0.0162	0.0081
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0293	0.01465
D-glucosa	0.1	0.05
Glutamina	0.0146	0.0073
Taurina	0.0876	0.0438
Hipotaurina	0.0546	0.0273
NaHCO ₃	0.2106	0.1053
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.025	0.0125
Penicilina G	0.0075	0.00375
Estreptomicina	0.005	0.0025

1. Usar agua mili-Q, tomar con la probeta, colocar en vaso de precipitado de 50 mL y agregar las sales
2. Ajustar pH 7.2-7.4
3. Aforar
4. Filtrar (0.45 µL)
5. Almacenar a 4 °C

Nota: Duración 3 semanas

Suplemento NCSU-23: el mismo día de FIV por la mañana

1. Suplementar 10 mL con 0.04 g de BSA 8022
2. Dejar reposar 15-20 min, mezclar suavemente sin formar burbujas
3. Filtrar (0.22 µL)
4. Preparar cajas e incubar.

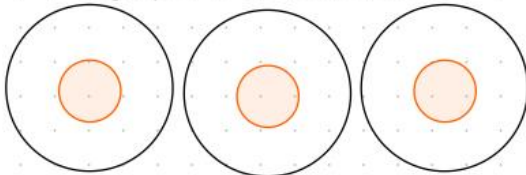
Biól. Exp. Jessica Elivier Núñez Macías

PREPARACIÓN DE CAJAS PARA CULTIVO

TBM (Medio de FIV)

500 μ L de TBM suplementado + aceite mineral

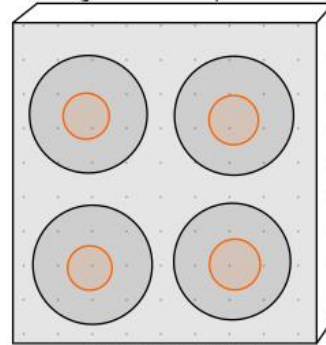
Cajas petri de 60 mm de diámetro:



LAVADOS

50 μ L de TBM suplementado + aceite mineral

Caja de cuatro pozos:

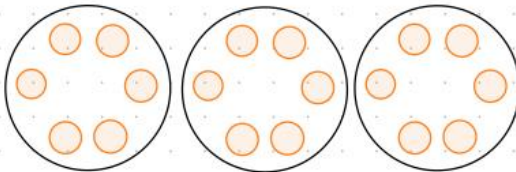


INCUBACIÓN

NCSU-23 (Medio de desarrollo embrionario)

50 μ L de NCSU-23 suplementado + aceite mineral

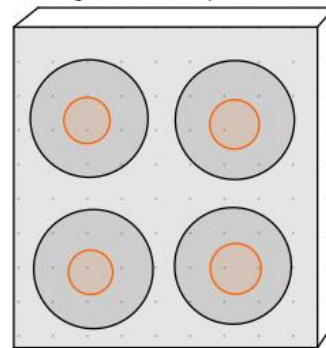
Cajas petri de 60 mm de diámetro:



LAVADOS

500 μ L de NCSU-23
suplementado + aceite mineral

Caja de cuatro pozos:



INCUBACIÓN

DPBS (Medio de lavado para espermatozoides)

10 mL



10 mL



Antes de empezar la FIV, 2 h antes se preparan dos jeringas con DPBS suplementado y filtrado, una vez preparadas se guardan en la incubadora.

Biól. Exp. Jessica Elivier Núñez Macías

Lavado de espermatozoides

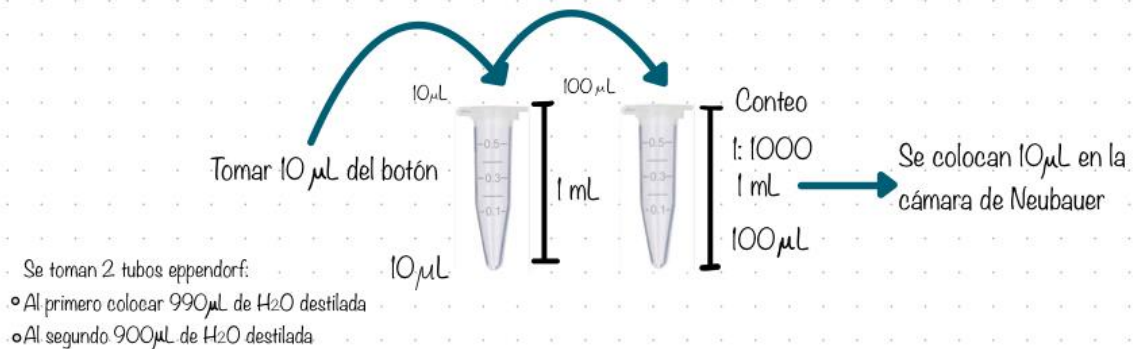
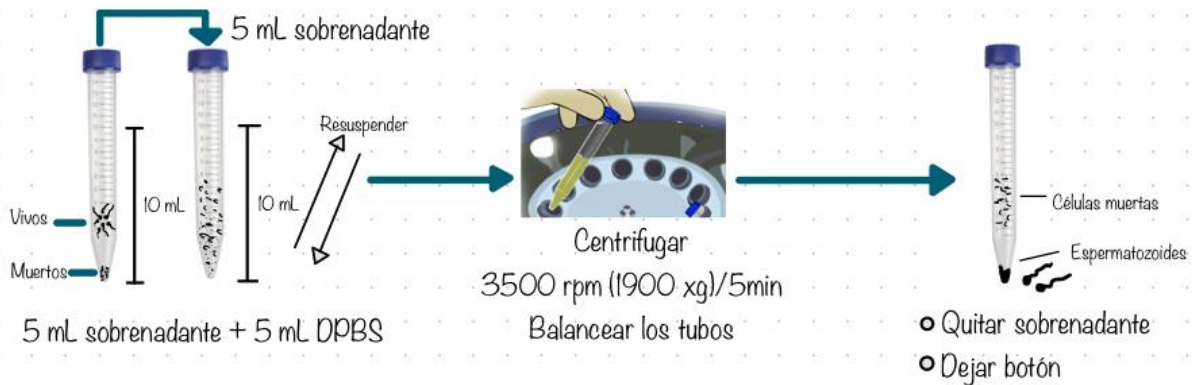
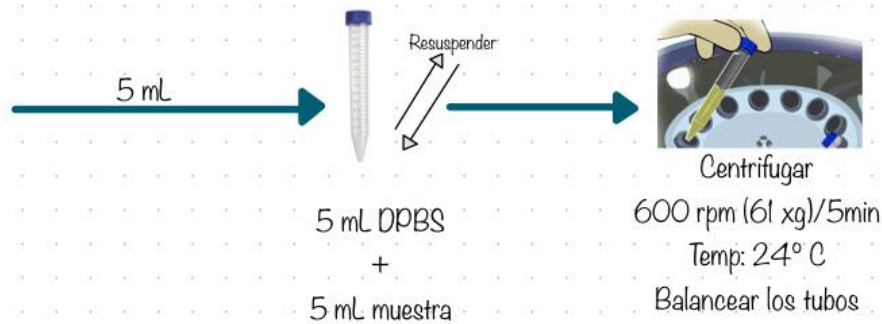
DPBS (el que se puso en las jeringas)

Muestra original



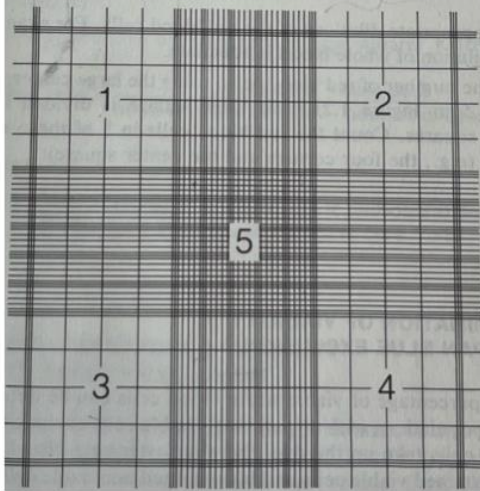
1 gota, evaluar:

- [*sw*]
- Movilidad



Biól. Exp. Jessica Elivier Núñez Macías

Conteo espermático



Se hacen conteos de espermatozoides en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4.
Únicamente los que están dentro de los cuadros, los que están sobre las líneas no se cuentan.

Ejemplo:

Número de espermatozoides por cuadrante

$$\begin{array}{r}
 39 \\
 + 57 \\
 56 \\
 38 \\
 \hline
 190 \div 4 = 47.5 \times 10^3
 \end{array}$$

Así es el conteo de la cámara de Neubauer, pero para contar spz se hace $\times 10^5$

$$\frac{4750 \times 10^3}{10 \times 10^6} = \frac{475 \mu\text{L TBM}}{1 \mu\text{L muestra}} \times 5 = \underline{2375 \mu\text{L de TBM y } 5 \mu\text{L}}$$

Preparación de Propil-Parabeno (PrPB)

Solución stock de PrPB

Solubilidad del propil en etanol:

0.463 g/L a 20 °C

Peso molecular: 180.20

180.20 g/mol — 1000 mL — 1M

0.463 g — 1000 mL es a: **2.56 mM**

Preparación de etanol al 20%

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (70\%) = (10 \text{ ml}) (20\%)$$

10 mL x 20% / 70% = 2.8 mL de EOH al 70 % en 7.2 mL de NCSU-23 suplementado.

Preparación stock

	1L	50 mL	10 mL
PrPB	0.463 g	0.023 g	0.0046 g

◦ Se colocan 0.0046 g para 10 mL de etanol al 20%

1. Tomar el volumen deseado de etanol a preparar en un vaso de precipitado
2. Agregar la cantidad correspondiente de PrPB
3. Filtrar, etiquetar y guardar a 4 °C

Concentraciones por pozo

25 μ M

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (2.56 \text{ mM}) = (500 \mu\text{M}) (0.025 \text{ mL})$$

$$= \frac{(500 \mu\text{L}) (0.025 \text{ mM})}{2.56 \text{ mM}} = 4.88 \mu\text{L de PrPB y } 495.12 \mu\text{L de NCSU-23}$$

50 μ M

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (2.56 \text{ mM}) = (500 \mu\text{M}) (0.05 \text{ mL})$$

$$= \frac{(500 \mu\text{L}) (0.05 \text{ mM})}{2.56 \text{ mM}} = 9.76 \mu\text{L de PrPB y } 490.2 \mu\text{L de NCSU-23}$$

100 μ M

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (2.56 \text{ mM}) = (500 \mu\text{M}) (0.1 \text{ mM}) \\ = \frac{(500 \mu\text{L}) (0.1 \text{ mM})}{2.56 \text{ mM}} = 19.53 \mu\text{L de PrPB y } 480.4 \mu\text{L de NCSU-23}$$

150 μ M

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (2.56 \text{ mM}) = (500 \mu\text{M}) (0.15 \text{ mM}) \\ = \frac{(500 \mu\text{L}) (0.15 \text{ mM})}{2.56 \text{ mM}} = 29.2 \mu\text{L de PrPB y } 470.8 \mu\text{L de NCSU-23}$$

200 μ M

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (2.56 \text{ mM}) = (500 \mu\text{M}) (0.2 \text{ mM}) \\ = \frac{(500 \mu\text{L}) (0.2 \text{ mM})}{2.56 \text{ mM}} = 39.06 \mu\text{L de PrPB y } 460.94 \mu\text{L de NCSU-23}$$

300 μ M

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (2.56 \text{ mM}) = (500 \mu\text{M}) (0.3 \text{ mM}) \\ = \frac{(500 \mu\text{L}) (0.3 \text{ mM})}{2.56 \text{ mM}} = 58.59 \mu\text{L de PrPB y } 441.41 \mu\text{L de NCSU-23}$$

500 μ M

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (2.56 \text{ mM}) = (500 \mu\text{M}) (0.5 \text{ mM}) \\ = \frac{(500 \mu\text{L}) (0.5 \text{ mM})}{2.56 \text{ mM}} = 97.65 \mu\text{L de PrPB y } 402.33 \mu\text{L de NCSU-23}$$

1000 μ M

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (2.56 \text{ mM}) = (500 \mu\text{M}) (1 \text{ mM}) \\ = \frac{(500 \mu\text{L}) (1 \text{ mM})}{2.56 \text{ mM}} = 195.31 \mu\text{L de PrPB y } 304.69 \mu\text{L de NCSU-23}$$

PBS: Lavado de tinciones

	q/ 200 mL	q/ 100 mL	q / 50 mL
NaCl	1.6	0.8	0.4
KCl	0.04	0.02	0.01
Na ₂ HPO ₄	0.3	0.15	0.075
KH ₂ PO ₄	0.04	0.02	0.01

Suplemento de PBS-BSA: Para evitar adhesión a las puntas.

* 0.003 g de BSA 8022 por 1 mL de PBS

Hormonas LH y FSH (merional 75 UI IBSA)

Solución stock 10x

1. Pesar hormonas 0.005 g (5 mg)
2. Vaciar en un tubo de 15 mL
3. Añadir 10 mL de medio TCM-199
4. Homogenizar

Solución 1x

1. De la solución stock, tomar 1 mL y llevarlo a 10 mL con TCM-199 mínimo (1 mL de stock+ 9 mL de TCM-199)
2. Filtrar solución
3. Preparar viales de un volumen de 50 μ L
4. Congelar a -20 °C

* El medio se añade por las paredes del tubo para no hacer burbujas

Preparación NaOH: para equilibrar pH (+)

30 lentejas en 25 mL de agua destilada

Técnica de Fertilización in vitro (FIV) y desarrollo embrionario (DE)

DÍA 1

1. Se desnudan los ovocitos por medio de acción mecánica con ayuda de una micropipeta de $100\mu\text{L}$, se retiran del medio de MIV.
2. Se pasan los ovocitos por un tren de lavado con medio TBM suplementado.
3. Se depositan los ovocitos en la caja de 4 pozos con TBM suplementado y se mantienen en incubación hasta su uso.
4. Se procesa la muestra de semen.
5. Se realiza el conteo de espermatozoides y se agregan $50\mu\text{L}$ de la dilución final a los ovocitos en el medio TBM.
6. Se mantienen en incubación por 6 h (tiempo de la fertilización, co-cultivo de gametos).
7. Posterior a ese tiempo, se pasan los ovocitos al tren de lavado ahora con el medio NCSU-23 suplementado hasta retirar el exceso de espermatozoides.
8. Se depositan los ovocitos en la caja de 4 pozos con medio NCSU-23 suplementado y se mantienen a incubación el tiempo requerido según la etapa de desarrollo que se desee evaluar.

DÍA 2

9. Si se requiere evaluar fertilización, en el modelo porcino se fijarán los ovocitos a las 12- 16 h después de la FIV (máximo a las 18 h).

DÍA 3

10. Si se requiere evaluar DE temprano, se fijarán los embriones a las 40 h después de la FIV.

DÍA 5-6

11. Si se requiere evaluar blastocistos, estos se fijarán a las 96 h después de la FIV.



EFFECTOS DEL PROPILPARABENO
EN EMBRIONES PORCINOS
PRODUCIDOS IN VITRO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 12 del mes de marzo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS
DRA. ALMA GUADALUPE LOPEZ LOPEZ
DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO
DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ



JESSICA ELIVIER NUÑEZ MACIAS
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera 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: JESSICA ELIVIER NUÑEZ MACIAS

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

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

VOCAL

DRA. ALMA GUADALUPE LOPEZ LOPEZ

VOCAL

DR. JUAN JOSÉ RODRIGUEZ MERCADO

SECRETARIO

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ