





**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**EFFECTO DE LA EDAD REPRODUCTIVA AVANZADA  
SOBRE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN OVOCITOS DE  
RATÓN HEMBRA DE LA CEPA CD-1.**

**Tesis que para obtener el título de**

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**Presenta:**

**ALI URBINA AMADOR**

**Director de Tesis**

**Dra. ROSALINA MARIA DE LOURDES REYES LUNA**



**SEPTIEMBRE 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la vida por permitirme llegar hasta donde estoy, por ponerme obstáculos en el camino y sin importar lo que suceda hay que seguir adelante.

A mi familia por todos los consejos y el apoyo moral que me brindaron, ya que ellos influyeron para convertirme en la persona que soy.

A una persona especial por el apoyo brindado, por los consejos, puntos de vista y darme ánimos para seguir en este proyecto.

A la Dra. Rosalina Reyes Luna por todo el conocimiento compartido, risas, experiencias de vida, por brindarme el apoyo necesario y la paciencia para lograr esta meta.

A mis tutores de tesis por los puntos de vista en este trabajo, ya que sus críticas sirvieron para mejorarlo.

Al M.C Gonzalo Yanes Gómez por compartir el conocimiento en estadística y haberme ayudado en el análisis de mis datos.

.

## **DEDICATORIA**

A mi Madre

Por ser una persona importante en mi vida, con todo mi amor y cariño, por su sacrificio y esfuerzo, al brindarme siempre el apoyo moral y económico, por sus consejos que hacen de mí una mejor persona y por darme una carrera para formarme como profesionalista.

A mis Abuelos

Noé Amador Oliver y Elia Cortes Gutiérrez que descanse en paz, por ser una gran parte en mi formación, por cuidar de mí la mayor parte de mi niñez, por enseñarme el convivir y el valor de la familia y sobre todo el consentirme.

## INDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Ovario</b> .....	<b>1</b>
<b>Ovogénesis</b> .....	<b>2</b>
<b>Dinámica de crecimiento folicular</b> .....	<b>4</b>
<b>Cambios endocrinos en la menopausia</b> .....	<b>6</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>8</b>
<b>Fragmentación del ADN</b> .....	<b>8</b>
<b>Salud génica</b> .....	<b>9</b>
<b>Aneuploidía</b> .....	<b>9</b>
<b>Anomalías estructurales</b> .....	<b>10</b>
<b>Translocaciones</b> .....	<b>10</b>
<b>Electroforesis en gel de agarosa</b> .....	<b>10</b>
<b>Ensayo Cometa</b> .....	<b>12</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>13</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>14</b>
<b>General</b> .....	<b>14</b>
<b>Particulares</b> .....	<b>14</b>
<b>Métodos</b> .....	<b>15</b>
<b>Ensayo Cometa en COC de ratón</b> .....	<b>16</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>18</b>

<b>Fragmentación de células foliculares .....</b>	<b>19</b>
<b>Fragmentación de ovocitos .....</b>	<b>20</b>
<b>Fragmentación de células foliculares y ovocitos primarios y metafase II en ratones hembra de 10 semanas de edad .....</b>	<b>21</b>
<b>Fragmentación de células foliculares y ovocitos primarios y metafase II en ratones hembra de 9 meses de edad .....</b>	<b>22</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>24</b>
<b>Conclusión .....</b>	<b>26</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>27</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>29</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>31</b>

## Resumen

Los organismos que se reproducen sexualmente requieren la ayuda de un espermatozoide producido en los testículos los cuales empiezan a formarse en la pubertad y un ovocito que es el gameto femenino que procede del evento de maduración folicular que es efectuado en los ovarios. Los ovocitos tienen la capacidad de reparar en un 76% el ADN del espermatozoide en la fecundación. Al llegar a la menopausia estropausia esta capacidad disminuye y gran cantidad de daños al ADN se presentan en el ovocito y no en el espermatozoide. Por ello es importante determinar en ratones hembras de la cepa CD-1 de 9 meses (9m) de edad si existe fragmentación en el ADN del ovocito. Para ello se realizó la prueba Cometa a complejo cúmulo-ovocito (COC) de ovocitos primarios (P) y en metafase II (MII) de ratones hembra de 10 semanas (10s) y 9 meses (9m) de edad. Se analizaron microfotografías de COC en ovocitos P y MII, en donde se pudo observar la presencia de fragmentación del ADN del núcleo de las células foliculares (nCF) y/o núcleo colapsado (NC) del ovocito. En el 34% de los ovocitos P de ratones de 10s, se encontraron con ADN fragmentado en nCF, de los cuales el 20% presentó NC. Para los ovocitos en MII, el 59% presentó nCF fragmentados y de ellos 19% presentó NC. Mientras que para ratones de 9m, el 35% de los ovocitos P presentó nCF fragmentados y de ellos el 20% NC, por otro lado para ovocitos en MII el 45% contiene nCF fragmentadas y de ellos un 25% presentó NC. Cuando se determinó solo la presencia de NC sin importar que los nCF estuvieran presentes o no, encontramos un 64% en ovocitos P y un 19% en MII en ratones de 10s. En ratones de 9m encontramos un 59% en ovocitos P y un 41% en ovocitos MII.

## INTRODUCCIÓN

El proceso reproductivo es uno de los eventos más complejos y fascinantes de la naturaleza, pues representa para cada individuo la posibilidad de perpetuarse a través de sus descendientes. Para ello, los organismos que se reproducen sexualmente requieren la participación de espermatozoides que son producidos en los testículos en la pubertad y ovocitos, gametos femeninos que proceden del evento de maduración folicular efectuado en el ovario (Cornejo. 2009).

## OVARIO

El ovario es un órgano intraperitoneal que morfológicamente cambia respecto a la especie, en el ratón mide aproximadamente 80 micrones de diámetro, (Benavides & Guénet. 2003). En cuanto al humano es ovalado y algo aplanado (4 x 2 x 1 cm). Presenta una superficie lisa antes de la pubertad pero, durante la vida fértil, va adquiriendo una serie de cicatrices superficiales debidas a las ovulaciones que hacen que la superficie sea irregular. Al finalizar la vida fértil, en la menopausia, el ovario se ha reducido a un cuarto de su volumen inicial. Este órgano está constituido por **folículos ováricos**, que se desarrollan en la corteza del ovario de hembras sexualmente maduras y difieren entre sí por el tamaño de los ovocitos que contienen en su interior y por el grado de diferenciación de estos. ( Konig. *et al.* 2008) (Figura 1).

### Funciones del ovario:

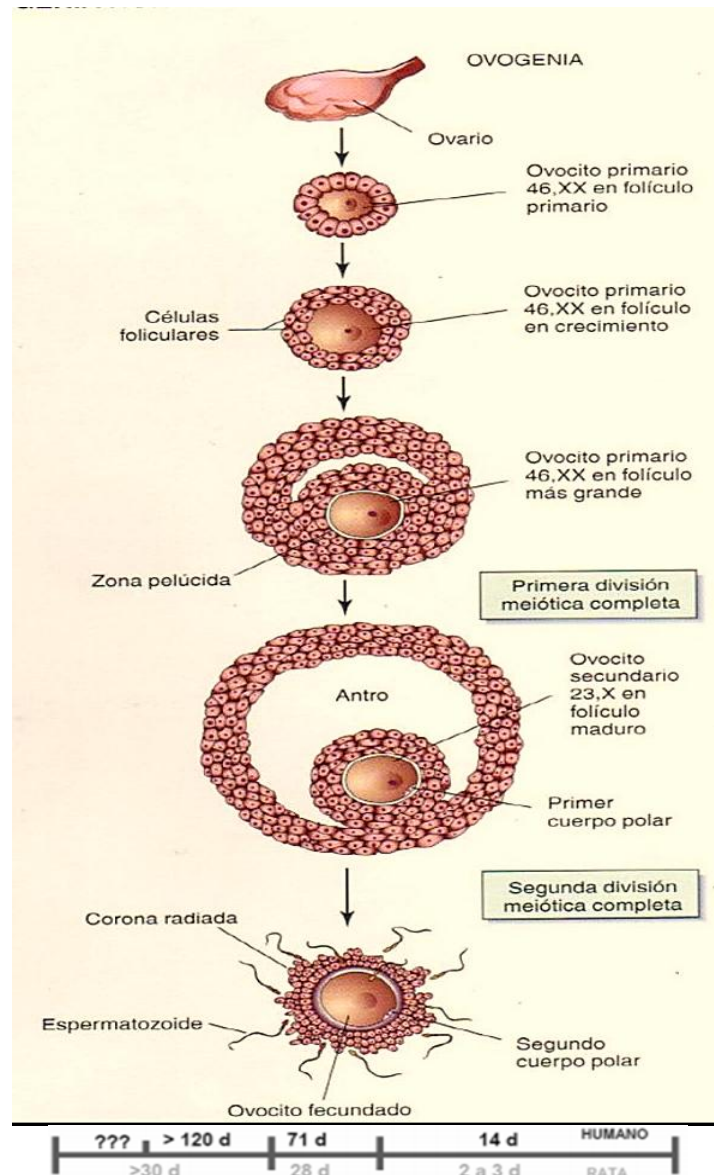
- ♣ Ovogénesis: Consiste en la proliferación y diferenciación de las células germinales femeninas que darán origen a los óvulos.
- ♣ Síntesis y liberación de hormonas sexuales femeninas: Consiste en la liberación de estrógenos y progesterona durante el ciclo menstrual. (Ross & Pawlina, 2009).



## **OVOGÉNESIS**

Las células germinales (ovogonias) aparecen en una fase temprana del desarrollo embrionario, aproximadamente a finales de la tercera semana, las ovogonias se dividen por mitosis y crecen para formar ovocitos primarios, lo rodean una capa de células epiteliales aplanadas y foliculares, creando un folículo primordial, con una carga genética de 46 cromosomas XX en el caso de la mujer, en el caso de los ratones el número estándar de 40 cromosomas XX, con 19 pares de cromosomas autosómicos ( todos ellos acrocéntricos) y la pareja de cromosomas sexuales ( Zamorano, *et al.* 2007).

Al final de la vida fetal los ovocitos inician la primera división meiótica pero se detiene en la fase final de la profase: los ovocitos primarios se mantienen latentes en los folículos ováricos hasta la pubertad, cuando madura un folículo el ovocito primario aumenta de tamaño, las células epiteliales y foliculares se tornan cuboidales y luego cilíndricas, poco antes de la ovulación termina la primera división meiótica y se detiene en metafase II, dando origen a un ovocito secundario, el cual recibe el citoplasma con una carga genética de 23(X) cromosomas y al primer corpúsculo polar (sin citoplasma) con 23(X) cromosomas. En la ovulación, el núcleo del ovocito secundario inicia la segunda división meiótica, pero sólo llega hasta metafase deteniéndose la división. Si el espermatozoide fecunda al ovocito se termina la segunda división meiótica, genera el segundo corpúsculo polar, en cual es expulsado (Figura. 1) y con esto finaliza la maduración del ovocito (Moore, *et al.* 2009).

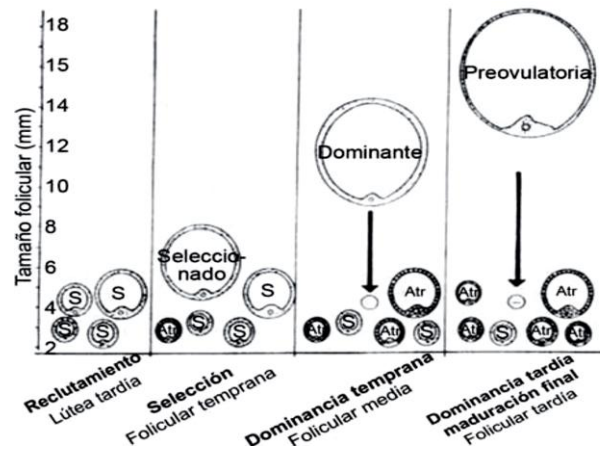


**Figura1.** Diagrama que representa las diferentes fases de la división meiótica en el desarrollo de un ovocito de mamíferos. Podemos observar que la ovogonia que experimenta crecimiento y pasa a etapa de ovocito primario el cual inicia la primera división meiótica, al final de esta etapa el citoplasma se divide asimétricamente dando origen a dos células la primera el lóbulo polar y la segunda el ovocito secundario. Cuando este óvulo es fecundado reanuda la segunda división meiótica y libera el segundo lóbulo polar (Moore, et al.2013).

## **DINÁMICA DE CRECIMIENTO FOLICULAR.**

En la mujer el ovario tiene una estimulación para la ovulación del sistema hipotálamo- hipófisis, durante el ciclo menstrual en donde experimenta la participación de dos gonadotropinas hipofisarias, la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona leutinizante (LH). De acuerdo con Gougeon en 1986 propuso una dinámica de crecimiento folicular en el humano con la liberación de estas hormonas:

- ♣ **Fase de crecimiento preantral:** En este momento transformación del ovocito primario a secundario, no se tiene información de cómo el ovocito llega a ser la célula más grande, pero lo que sí es que las células de la granulosa se van diferenciando a tal grado que algunas poseen mayores concentraciones de enzimas implicadas en la esteroidogénesis y el desarrollo posterior de receptores para hormona luteinizante, que es hasta después de la pubertad donde el pico de hormona LH recluta ovocitos primarios para desarrollarse en secundarios.
- ♣ **Fase de crecimiento periantral:** En esta fase Las células de la granulosa adquieren receptores para hormona folículo estimulante (FSH), andrógenos y estradiol (E2); y el folículo debe alcanzar su estadio de secundario maduro para ser reclutado en la siguiente fase de crecimiento.
- ♣ **Fase de crecimiento exponencial:** Esta fase depende de gonadotropinas y consta de cuatro eventos (reclutamiento, selección, dominancia y ovulación). Esta comprende la evolución de los folículos que se realiza durante la primera fase del ciclo ovárico, en la cual ocurre la selección y dominancia de un solo folículo entre varios disponibles y el resto se elimina por el proceso de atresia.



**Figura 2.** Fase de crecimiento, se muestra el desarrollo de los ovocitos, mostrando aquel que será ovulado. (Cornejo, 2009).

Por otro lado cuando aumenta la concentración de LH y que las células de la granulosa han logrado adquirir receptores para esta gonadotropina, empieza a sintetizar estrógenos y progesterona. En conjunto la LH y la progesterona inducen la síntesis de péptidos y sustancias que preparan al folículo para la ovulación. En este momento el ovocito completa su primera división meiótica. Dentro de las sustancias sintetizadas se encuentran algunas proteolíticas que poco a poco van digiriendo los puentes de unión intercelular hasta que logran separar el ovocito de las células de foliculares y permite la ovulación (Jácome, 2005).

En el ovario de la mujer existen aproximadamente 1,000,000 ovocitos en el momento del nacimiento; cuando llega la pubertad, de estos solo permanecen aproximadamente 400,000 folículos. Sin embargo, tan sólo 400 folículos serán ovulados durante la vida reproductiva de la mujer. En este suceso fisiológico del organismo, se procura que las células que lo controlan ahorren energía, ya que de los 400 folículos seleccionados de manera natural, solo un ovocito será liberado durante la ovulación en cada ciclo reproductivo. (Pérez, 2005).

Después de los 35 años de edad disminuye la etapa reproductiva (Menken, 1986), el ovario disminuye de tamaño, peso y contiene menos ovocitos y estructuras foliculares y más folículos atrésicos en degeneración, llega un momento en que faltando los elementos básicos del ciclo, como lo son los folículos primordiales o primordios, los ciclos reproductivos se terminan y aparece la

menopausia. Se acepta que puede ocurrir entre 35 y 55 años; y como promedio 50 años de edad. Por debajo de los 40 años se considera menopausia temprana y por encima de los 52, tardía. (Botell, *et al.* 1997).

### **CAMBIOS ENDOCRINOS DE LA MENOPAUSIA.**

Cuando se presenta el último año de sangrado menstrual, la función reproductiva del ovario se pierde y posteriormente la secreción de hormonas, de manera que la fertilidad va disminuyendo. Al envejecer en el folículo ovárico hay una disminución rápida en el número de ovocitos, por desgaste (atresia) o consumo, que comienza en el desarrollo embrionario y se extiende hasta la menopausia. Los cambios endocrinos empiezan a observarse en la perimenopausia (suele acompañarse de alteraciones del ciclo en cuanto a cantidad de sangrado o frecuencia de presentación del mismo), así como la producción de ovocitos defectuosos (descendiendo la fecundidad) y alteraciones del ciclo (sangrados irregulares en duración y/o cantidad, alteraciones en la duración de los ciclos). (Rubio, 2012)

Teóricamente, establecida la menopausia ya no quedan folículos, pero a veces es posible encontrar alguno capaz de producir una mínima dosis de hormona, pero incapaz de producir una ovulación. Ello explica las fluctuaciones hormonales, de tan pequeña cantidad que incluso son incapaces de producir sangrado menstrual.

La estropausia es el proceso de la senescencia reproductiva en los roedores definido como un estado acíclico anestro (Supulveda, *et al.* 2007), dicho proceso inicia entre los nueve y doce meses de edad (Felicio, *et al.* 1984). Los ratones en laboratorio alcanzan una madurez sexual a partir de la séptima u octava semana de vida y esta se prolonga hasta aproximadamente 13 meses de edad (Benavides, *et al.* 2003).

En la mujer durante la etapa reproductiva, el ovocito tiene la capacidad de reparar el daño al ADN espermático en un 76% aunque esta capacidad es limitada y

puede variar de ovocito en ovocito e, incluso, entre diferentes cohortes de ovocitos. Después de esta etapa la capacidad de reparación depende de la edad de la hembra y del tipo de daño al ADN (Sakkas & Álvarez, 2011) entre los más importantes.

El daño al ADN en los espermatozoides puede afectar al ADN mitocondrial, pero son capaces de fertilizar de manera eficiente un óvulo. Sin embargo, la capacidad del ovocito y del embrión humano de reparar el daño al ADN es poco conocida y nuestro conocimiento actualmente se limita a un cierto número de estudios de expresión genética que muestran que el embrión y los ovocitos están equipados con mecanismos para hacer frente a algunas anomalías en el ADN paterno y este daño puede afectar la salud del embrión, la del feto e incluso la de la descendencia global (Ollero, *et.al.* 2001).

El daño en el ADN encontrado en el embrión no siempre se relaciona con el daño en el ADN del espermatozoide que fertilizó al ovocito, un nivel significativo de anomalías del ADN surge del ovocito (Faragouli, *et.al.* 2006).

Una estrategia que se realiza en la actualidad para examinar si el daño al ADN del ovocito ha sido o no reparado durante el desarrollo embrionario es mediante el análisis de fragmentación de ADN en células trofoblásticas obtenidas mediante biopsia del blastocisto, esta metodología es invasiva para el embrión y además muy costosa. (Sakkas & Álvarez, 2011).

## ANTECEDENTES

### Fragmentación del ADN

Por fragmentación del ADN se entiende el conjunto de alteraciones que pueden ocasionar las roturas de la doble hélice, principalmente de una o doble cadena, si como alteraciones que impliquen modificaciones de bases nitrogenadas o proteínas que pueden inducir la formación de nuevas roturas de ADN (Barratt, et al, 2010)

La integridad del material genético en los gametos, es clave primordial en los procesos reproductivos del ser humano. El significado clínico de la evaluación del ADN espermático está asociado no solo con los índices de embarazo naturales, sino también con el éxito de embarazo mediante las técnicas de reproducción asistida. Los óvulos y espermatozoides con el ADN dañado pueden llevar a la transmisión de un material genético alterado con consecuencias negativas en el proceso de fertilización, desarrollo del embrión y la calidad de la progeie.

El daño al ADN (fragmentación) en los ovocitos puede afectar al ADN mitocondrial así como al ADN nuclear y puede ser inducido fisiológicamente mediante varios mecanismos como son:

- ♣ Apoptosis durante el proceso de ovogénesis.
- ♣ Lesiones producidas por radicales libres de oxígeno durante su permanencia en el ovario desde la etapa embrionaria.
- ♣ Fragmentación del ADN inducida por caspasas endógenas y endonucleasas.
- ♣ Daño en el ADN inducido por radiaciones.
- ♣ Daño al ADN inducido por tóxicos ambientales. (Arabi, 2004).

Se ha postulado que, en embriones generados *in vivo e in vitro*, la presencia de daño al ADN por encima de un umbral crítico en donde ya no se reparara, explica el bloqueo en el desarrollo embrionario observado después de la implantación de embriones con un cariotipo normal. Estudios recientes sugieren que este tipo de

daño se expresa durante y después de la implantación y se ha caracterizado como efecto paterno o materno tardío. (Sakkas & Álvares, 2011)

En el futuro las técnicas analíticas pueden concentrarse en el uso combinado de sondas cromosómicas y pruebas de fragmentación de ADN en biopsias de embriones, lo que permitiría un análisis más exhaustivo, que incluya no sólo el diagnóstico de enfermedades monogénicas y aneuploidía, sino también el grado de daño del ADN en el embrión, lo que permitiría seleccionar embriones de la más alta calidad genómica. La biopsia embrionaria podría generar la destrucción de embrión y si resultara con daño en su ADN se tendría que decidir en la continuación de su desarrollo o desechar este embrión, lo cual implicaría problemas éticos. Los investigadores han concluido que el desarrollo embrionario y fetal está mucho más relacionado con el grado de daño al ADN y que el ovocito solo tiene la capacidad de repararlo en menos de 8%. (Sakkas & Álvares, 2011).

## **SALUD GÉNICA.**

La Salud Génica, está relacionada con el conocimiento actual de genética y el concepto de salud, obtención de una máxima salud génica nos llevaría a la realización de pruebas posiblemente interminables. (Soini, *et al.* 2006). Los trastornos genéticos mendelianos poseen patrones de herencia, en donde las anomalías específicas de cromosomas generan más de 60 síndromes identificables y han presentado ser más frecuentes que algún trastorno mendeliano. (Nussbaum, *et al.* 2008).

Algunos trastornos genéticos importantes son:

- ♣ **Aneuploidía** son las más frecuentes, clínicamente son trastornos cromosómicos que ocurren en al menos 3% de todos los embarazos clínicamente reconocidos. Consisten en la pérdida o ganancia de cromosomas. Si hay ganancia de un cromosoma se llama trisomía o Síndrome de Klinefelter, si hay pérdida de un cromosoma es una



monosomía o Síndrome de Turner, los más comunes en recién nacidos son el síndrome de Down, alteración genética causada por la copia extra del cromosoma 21, un tercio de los niños afectados con trisomía 21 nacen de madres de 40 años o más. (Nazer & Cifuentes. 2011), y el síndrome de Edwards, segunda trisomía común la cual afecta el cromosoma 18 son una serie de múltiples malformaciones mayores y déficits en el organismo que se evidencian desde la vida intrauterina (Villalva & Roca. 2014) El síndrome de Patau es una anomalía cromosómica, en la que hay una copia extra del cromosoma 13, se asocia a un problema meiótico materno más que paterno (Fleitas. 2014).

- ♣ **Anomalías estructurales**, consisten en una reordenación de la estructura del cromosoma debido a una rotura cromosómica seguida de una reconstitución en una combinación anormal.
  
- ♣ **Translocación**, consiste en el intercambio de segmentos cromosómicos entre cromosomas no homólogos. Este tipo de translocaciones puede originar un Síndrome de Down. (Pellestor, 2014).

Como sabemos, estos defectos cromosómicos pueden ser heredados a los descendientes, las técnicas que se utilizan para conocerlas deben ser usadas de manera rutinaria y así poder hacer frente a la enfermedad desde un principio, descartando la posibilidad de que se encuentre en el ADN del ovocito y así obtener una célula libre de daño en sus cromosomas lo que nos llevaría a lograr un embrión sano en las parejas con edad avanzada.

## ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. Electroforesis, “electro” que refiere a la electricidad carga y “foresis” del griego *phoros*, significa “trasladar”. (Somma, 2005). Esta técnica consiste en agregar corriente eléctrica a una placa de gel que contiene los compuestos a separar y de esta manera las moléculas se muevan en la placa de gel, ya sea hacia el ánodo o cátodo dependiendo de la naturaleza de la carga y masa que posean las moléculas. Se emplea para separar los ácidos nucleicos y las proteínas. Así, por ejemplo, cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo (Westermeier, 1997).

La electroforesis en gel de agarosa es un método estandarizado, que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Posteriormente estos fragmentos se pueden localizar tiñendo el gel con una concentración baja de bromuro de etidio, que es un agente fluorescente que se intercala en el ADN y que se utiliza como colorante. Cuando una muestra biológica de ADN, se mezcla en una solución tampón y se aplica a un gel, la carga y masa actúan conjuntamente. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza de fricción del material de gel actúa como “tamiz molecular”, separando las moléculas en función de su tamaño.

Durante la electroforesis, las macromoléculas son empujadas a través de los poros, la tasa de migración de estas moléculas por el campo eléctrico depende los siguientes factores:

- ♣ Fuerza del campo
- ♣ Tamaño y forma de las moléculas
- ♣ Hidrofobicidad relativa de las muestras
- ♣ Fuerza iónica y temperatura del tampón en que se desplazan

las moléculas.

La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductancia eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente o ni siquiera se desplaza. En un tampón de elevada fuerza iónica la conductancia eléctrica es muy elevada y se genera una importante cantidad de calor. Se dispone de varios tipos de tampones para la electroforesis de ADN nativo bicatenario que en general contienen EDTA (pH 8,0), tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o trisfosfato (TPE) a una concentración de aproximadamente 50 mM (pH 7,5 – 7,8).

## **ENSAYO COMETA**

Es un método microscópico fluorescente rápido y muy sensible, que permite examinar el daño al ADN en células de manera individual, producidos por un rompimiento de cadena simple o doble, daño oxidativo inducido y entrecruzamiento de ADN-ADN/ADN-proteína (Arabi, 2004).

Este ensayo tiene múltiples aplicaciones, por ejemplo en el caso de la genotoxicidad en donde se puede emplear en ensayos de antigenotoxicidad. (OECD, 2014). En los últimos años, el uso del ensayo cometa se ha extendido a las células germinales en donde se ha evaluado la integridad del ADN espermático, condiciones de estrés oxidativo en ovocitos porcinos y embriones bovinos; además, se ha utilizado para evaluar muerte celular en embriones de ratón, (Urrejo. *et.al*, 2005). En ovocitos esta prueba se ha empezado a utilizar **para evaluar genotoxicidad en el ADN**, en el trabajo elaborado por Urrejo y colaboradores, sometieron ovocitos a soluciones acidas de tirodes y proteínasa K, los sometieron a ensayo cometa el cual resultó viable ya que los ovocitos presentaron una morfología adecuada para evaluar el daño del ADN, por esta razón se requieren proteasas (Urrejo, et al. 2005).

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que el total de células germinales femeninas se desarrolla en etapas embrionarias y presentan un proceso de maduración hasta la etapa reproductiva (pubertad) en los humanos, los ovocitos permanecen un período de tiempo largo en el ovario y sobre todo cuando se presenta el final de la etapa reproductiva, lo que podría ocasionar defectos o fragmentación en su ADN y por ende problemas genéticos después de la fertilización, en el embrión en desarrollo.

Sería importante poder determinar si los COC en hembras con una etapa de estropusia presentan un daño importante en el ADN y poder establecer si son aptos para que el ratón hembra quede preñada.

Además, determinar el grado de fragmentación de los ovocitos en los humanos se evitaría el uso de blastómeras de embriones para el diagnóstico preimplantacional en etapas tempranas de desarrollo embrionario y su posible daño.

En el presente trabajo proponemos estudiar el grado de fragmentación de los ovocitos en ratones hembra que están en la terminación de su etapa reproductiva. En base a lo antes mencionado es importante analizar ovocitos obtenidos de hembras en etapa estropausica y poder inferir si el origen de los problemas génicos provenientes por parte del ovocito, son debidos a su posible fragmentación.

## **HIPÓTESIS**

Si el envejecimiento está relacionado con alteraciones en el ADN de los ovocitos, entonces en las ratonas hembra en etapa pre-menopáusica se encontrara mayor incidencia de fragmentación del ADN al comparase con ovocitos de ratones hembra en etapa reproductiva.

## **OBJETIVO**

### **General**

Determinar en ratones hembras de la cepa CD-1 de 9 meses de edad (estropausia) si existe fragmentación en el ADN de las células foliculares y del ovocito en COC.

### **Particulares.**

En COC de ovocitos primarios y en metafase II se determinará:

1. La fragmentación del ADN de las células foliculares y del ovocito en ratones hembras de 10 semana de edad de la Cepa CD-1.
2. La fragmentación del ADN de las células foliculares y de ovocito en ratones hembras de 9 meses de edad de la Cepa CD-1.
3. El desplazamiento de células foliculares y su correspondencia con la fragmentación del ADN de los ovocitos en ratones hembras de 10 semanas y 9 meses de edad de la Cepa CD-1.

## MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se realizaron 16 experimentos con ratones hembra de la cepa CD-1. Como grupo control de 20 hembras de 10 semanas (10s) de edad y el grupo experimental, con 20 hembras de 9 meses (9m), que previamente hayan tenido crías. Los grupos se mantuvieron bajo las condiciones de Bioterio Claude Bernard localizado en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Puebla. En cada experimento se trabajó con un individuo de cada grupo (10s y 9m).

A cada grupo de ratones hembras se les realizó un frotis vaginal para verificar la etapa del ciclo estral en el que se encontraban que va de 4 a 6 días. Cuando se experimentó se utilizaron solo hembras que estaban en etapa de estro que dura 8 a 12 horas, se sacrificaron por cámara de CO<sub>2</sub>, posteriormente se realizó una pequeña incisión en la parte ventral para poder recuperar los ovarios en una caja de Petri de 35 mm en medio CZB-H a temperatura ambiente, con la ayuda de dos agujas de insulina y un microscopio estereoscópico (NIKON, modelo C-DS), se eliminó el exceso de grasa y sangre del tejido. Se enjuagaron con una pipeta para retirar el resto de grasa y obtener una mejor visualización de ellos, se pasaron a una caja Petri limpia con medio CZB-H y cuidadosamente se seccionaron para así obtener (COC). Con una micro-pipeta de 5 ul se recuperaron COC en dos diferentes etapas de maduración: primarios y en metafase II. Se colocaron en una nueva caja Petri con medio CZB-H.

En promedio por cada hembra se seleccionaron 10 COC con ovocitos primarios y 10 COC con ovocitos en MII. Los 400 ovocitos obtenidos se sometieron a la prueba de fragmentación del ADN por medio del Ensayo COMETA (Arabi, 2004), a la cual se le realizaron modificaciones para adaptarla a ovocitos.

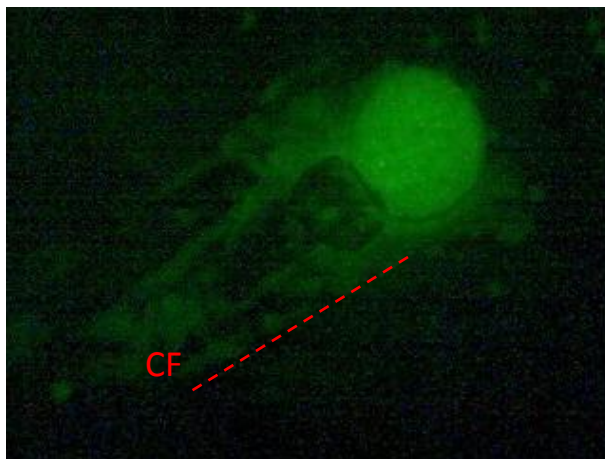
Los COC obtenidos se sometieron a la prueba de fragmentación del ADN por medio del Ensayo COMETA (Arabi, 2004), a la cual se le realizaron modificaciones para adaptarla a ovocitos en este caso COC.

## ENSAYO COMETA EN COCs DE RATÓN

Se fundamenta en la fragilidad que poseen los sitios de la cadena dañada; al ser sometidos a un pH alcalino y su comportamiento en una electroforesis. Los fragmentos de ADN, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la cola del “cometa”, entre más larga sea esta porción mayor será el daño que presenta el ADN (OECD.2014).

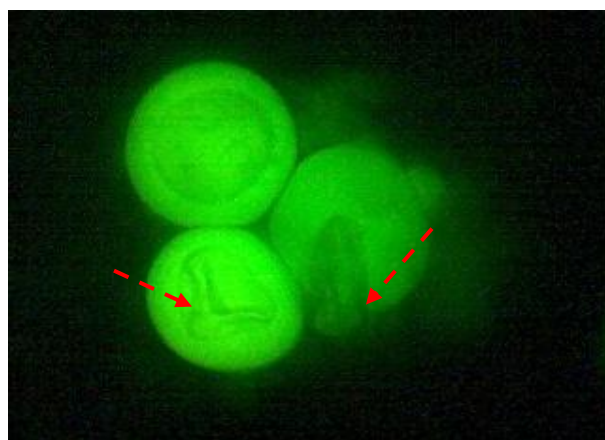
Para analizar el grado de fragmentación en el ADN de los ovocitos en un portaobjetos sobre una cama fría se prepararon micro geles en su superficie. A cada portaobjetos se les agregó 200  $\mu$ L de agarosa al 0.4%, se les colocó un cubreobjetos (24 x 50 mm) y se dejaron en la cama fría hasta gelificar, al micro gel se le retiró el cubre objetos, se le adicionó 100  $\mu$ L de agarosa al 0.3% y se colocaron rápidamente (antes de que el gel gelificara) 10 COC en 5  $\mu$ L de medio, en este paso no se colocó el cubre objetos para evitar que los ovocitos fueran destruidos (estallados). Se dejó gelificar y posteriormente se le adicionaron otros 100  $\mu$ L agarosa al 0.3% colocando esta vez el cubre objetos. Posteriormente a los micro geles se les colocó un buffer de lisis por 45 minutos, se lavaron con solución Tris 0.4 M y se corrió una electroforesis a 25 Voltios durante 30 min con solución TAE. Al término de la electroforesis, los micro geles se tiñeron con anaranjado de acridina durante 10 min, se retiró el exceso de colorante con solución TAE y se observaron bajo microscopia de fluorescencia con un filtro de excitación de 450 – 490nm. Se tomaron fotografías de los 400 COC con un objetivo 10x en un microscopio de epifluorescencia para su posterior análisis (Arabi, 2004).

En la prueba cometa realizada, se observó en las microfotografías capturadas de los COc la presencia de desplazamiento (fragmentación) de las células foliculares (CF) la cual se tomó como prueba positiva para Ensayo Cometa. Para la cuantificación de esta variable se tomaron en cuenta los 100 COC primarios y los 100 en metafase II de hembras de 10 semanas y 9 meses de edad que presentaban o no la formación de cometa por las CF. (Figura 3)



**Figura 3.** Microfotografía de fluorescencia de un CCO muestra el desplazamiento de las CF. En la línea punteada podemos observar este desplazamiento (fragmentación) lo que fue tomado como prueba positiva para el ensayo Ensayo Cometa.

En cuanto a la fragmentación del núcleo de los ovocitos de los COC tanto primarios y en metafase II en los ratones hembras de 10 semanas y 9 meses de edad, se tomó como prueba cometa positiva el colapso del núcleo (fragmentación del ADN). El no desplazamiento del ovocito durante la electroferesis posiblemente se debió a que no se observó rompimiento de la membrana plasmática de la célula durante la lisis y el ADN no logró migrar completamente y describir un cometa. (Figura 4)



**Figura 4.** Microfotografía de fluorescencia de un COC que muestra el colapso de núcleos, los cuales están señalados en flechas y se tomaron como prueba positiva para ensayo cometa.



Se observaron 200 COC de ratones hembra de 10s (P y MII) y 200 COC de 9m de edad (P y MII). De cada grupo se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos, mediante el programa Past versión 2.17 para determinar si los valores seguían una distribución normal. De lo contrario se utilizó la prueba estadística de Shapiro Wilk. Para los datos que tenían distribución normal se realizó un Anova y los que no la presentaban se efectuó la prueba estadística no paramétrica de Mann Whitney para determinar las diferencias estadísticamente significativas. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de  $p \leq 0.05$ .

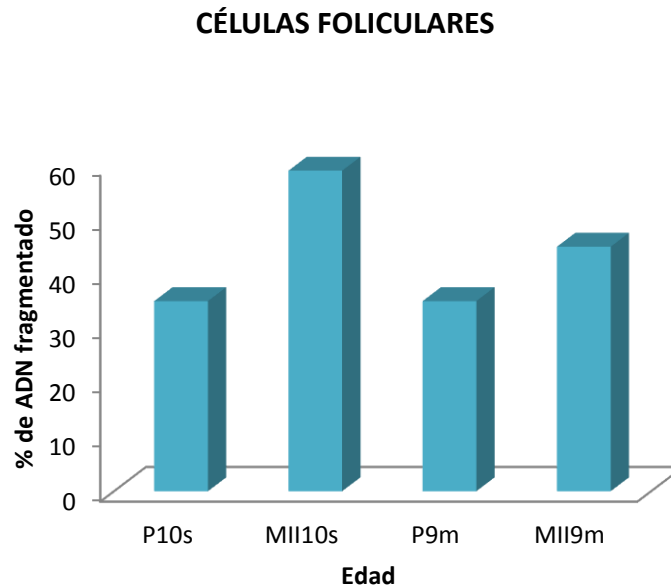
## **RESULTADOS**

Se logro implementar la prueba Cometa (diseñada para espermatozoides) en ovocitos de raton de la cepa CD-1. Las modificaciones que se realizaron fueron:

1. A la capa de gel del portaobjetos en donde se adicionaron los ovocitos no se le coloco cubreobjetos.
2. El tiempo de corrida de la electroforecic se aumento de 10 minutos a 30 minutos.
3. La tinción de los ovocitos con anaranjado de acridina se incrementó a 10 minutos.
4. Con estas modificaciones se observaron en los COCs el desplazamiento de células foliculares y colapso de los ovocitos..

## FRAGMENTACION DE CELULAS FOLICULARES.

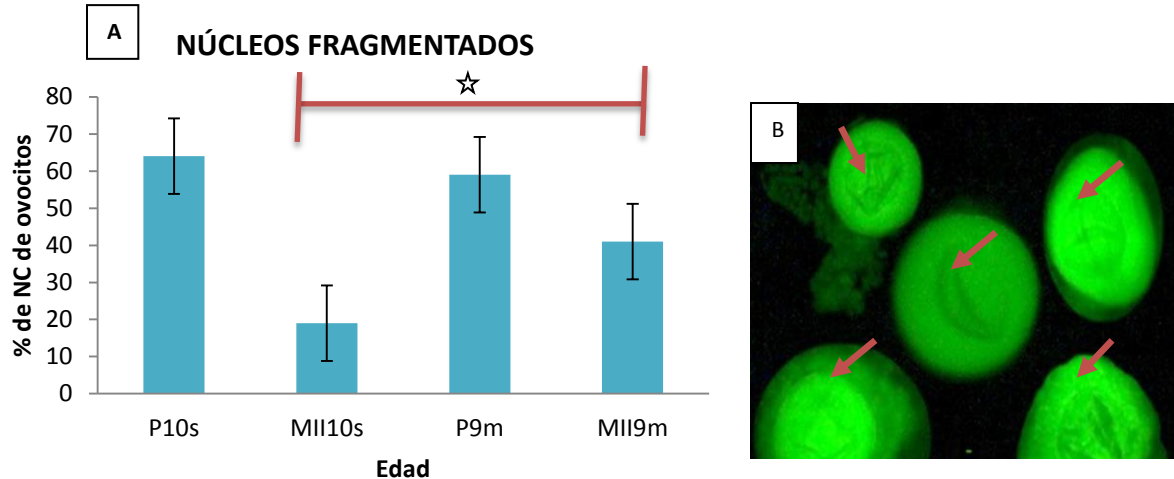
Después de la electroforesis, al analizar las microfotografías de fluorescencia en los COC de ratón hembra de 10 semanas de edad, se observó la fragmentación del ADN de CF de las cuales el 35% se presentó en COCs con ovocitos primarios y el 59% en metafase II, para ratones de 9 meses se encontró el desplazamiento de CF en un 35% en COCs con ovocitos en etapa primaria y un 45% en metafase II (Figura 5), no se observaron diferencias estadísticamente significativas  $p \leq 0.05$  entre estos dos grupos.



**Figura 5.** Gráfico que representa el porcentaje de células foliculares con ADN fragmentado en COCs primarios y en metafase II de 10s y 9m de edad. No se encontraron diferencias significativas  $p \leq 0.05$ .

## FRAGMENTACION DE NUCLEOS.

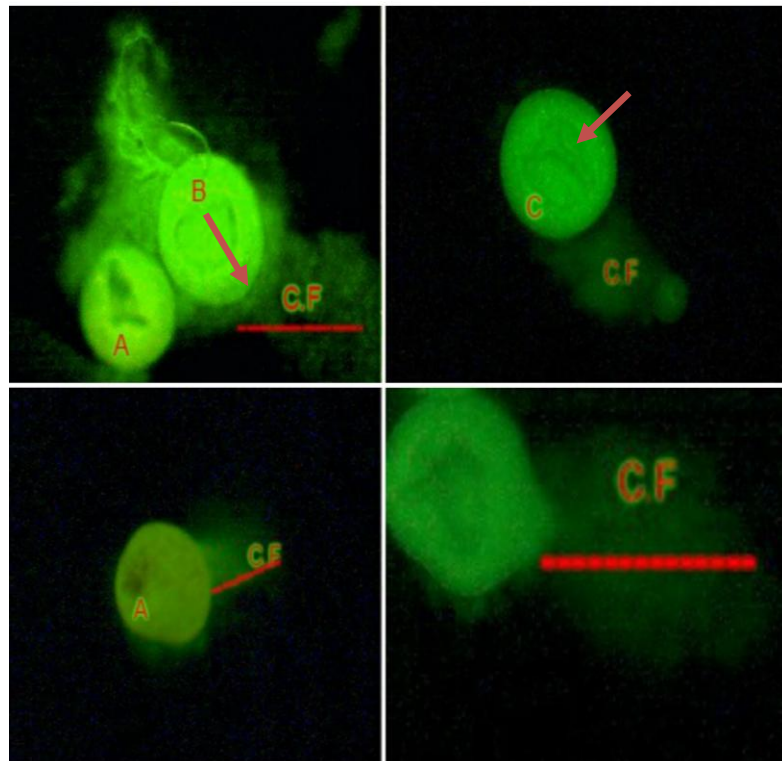
Cuando se determinó solo la presencia de núcleos colapsados en ovocitos de los COC, se encontró que los primarios presentaron un 64%, mientras que en metafase II un 19%, en ratones hembra de 10 semanas. En hembras de 9 meses encontramos un 59% de núcleos colapsados en ovocitos primarios (COC) y un 41% en ovocitos metafase II. Se puede observar que hay una disminución significativa del porcentaje de ovocitos colapsados en metafase II en ambas edades, debido, posiblemente a que durante su proceso de maduración los ovocitos con núcleos fragmentados sufren atresia folicular y solo llegan a madurar los que presentan el ADN sin o menor daño (Figura 6). En este caso si se encontró una diferencia estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los núcleos de ovocitos de metafase II de 9 meses con respecto a los núcleos de ovocitos (COC) de metafase II de 10 semanas.



**Figura 6.** Fragmentación de núcleos de ovocitos. **A)** Gráfica que representa el porcentaje de núcleos colapsados en ovocitos primarios y metafase II en ratones hembra de 10 semanas y 9 meses de edad. Se encontraron diferencias significativas  $p \leq 0.05$  entre los ovocitos en metafase II de las dos edades estudiadas (☆). **B)** Microfotografía de fluorescencia en donde se observan los núcleos colapsados de los ovocitos sin la migración de las células foliculares en los COC. (Flechas).

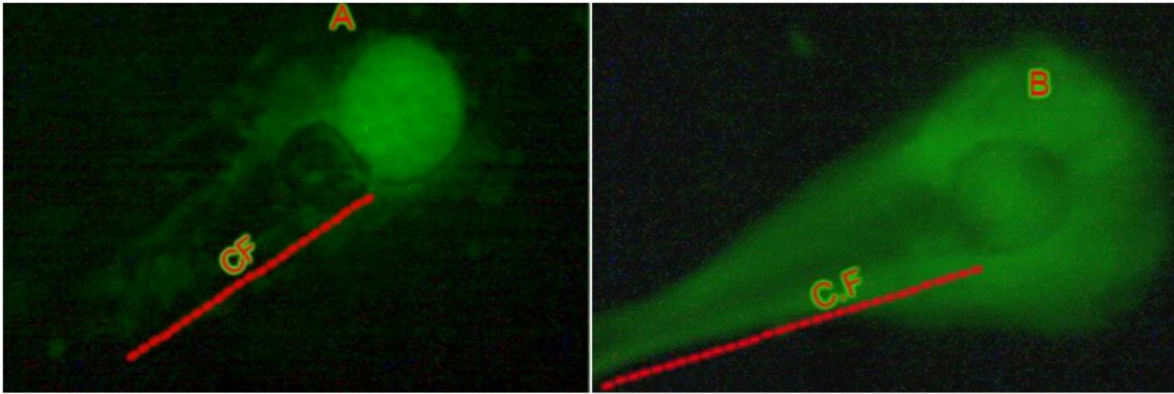
## FRAGMENTACION DE ADN DE CELULAS FOLICULARES Y OVOCITOS PRIMARIOS Y METAFASE II EN RATONES HEMBRA DE 10 SEMANAS DE EDAD.

Al analizar las microfotografías de fluorescencia de los COC con ovocitos primarios de ratones hembra de 10 semanas de edad se observó que el 34% de los ovocitos presentaron positiva la prueba cometa para células foliculares y de estos solo el 20% también presentaban NC (Figura 7).



**Figura 7.** Micrografía de fluorescencia de COC, ovocitos primarios de ratón hembra de 10 semanas de edad que muestran el desplazamiento de células foliculares (C.F) y núcleo colapsado (Prueba cometa positiva para CF y las flechas indican los núcleos colapsados).

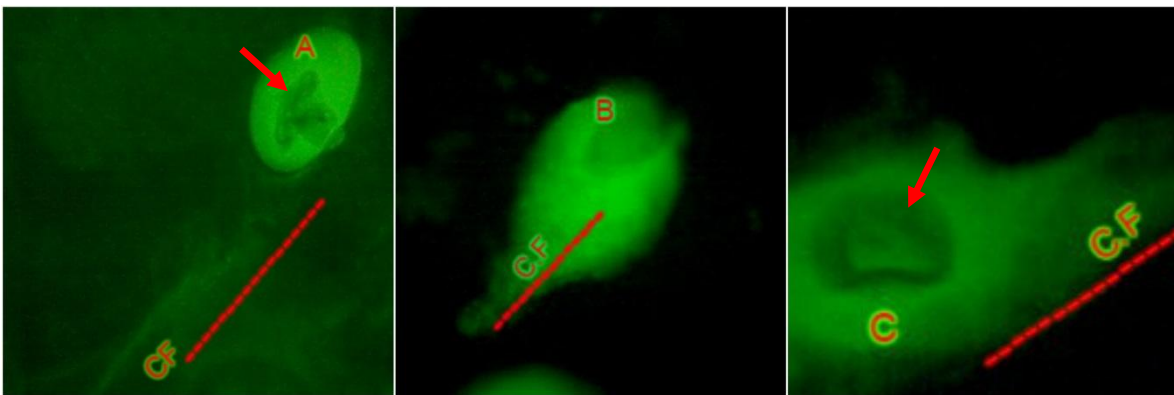
En los ovocitos metafase II de hembras de 10 semanas al observar las microfotografías de fluorescencia se encontró que el 59% de los COCs con desplazamiento de C.F contienen también el 19% de núcleos colapsado en ratones hembra de la misma edad. (Figura 8).



**Figura 8.** Micrografía de fluorescencia de COC, ovocitos en metafase II de ratón hembra de 10 semanas de edad que fueron sometidos a la prueba cometa. **A)** y **B)** Ovocito positivos a la prueba cometa para el desplazamiento de células foliculares (CF).

### FRAGMENTACIÓN DE ADN DE CELULAS FOLICULARES Y OVOCITOS PRIMARIOS Y METAFASE II DE RATONES HEMBRA DE 9 MESES DE EDAD

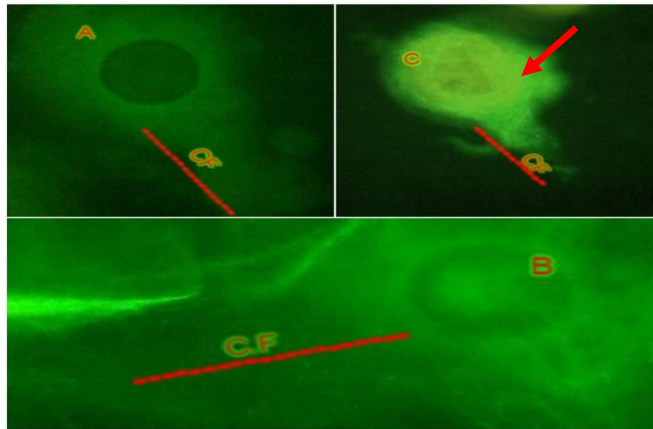
En las microfotografías de fluorescencia se observó que el 35% de ovocitos primarios de hembras de 9 meses de edad presentan positiva la prueba cometa para CF, de ellos el 20%, presentaron la prueba positiva para núcleos colapsados (Figura 9).



**Figura 9.** Micrografía de fluorescencia de COC, ovocitos primarios de ratón hembra de 9 meses de edad que fueron sometidos a la prueba cometa **A)** y **C)** Ovocitos que dieron positiva la prueba cometa para células foliculares (CF) y núcleos fragmentados (señalados con una flecha). **B)** Ovocito que muestra el desplazamiento de (CF).

Cuando se analizan las microfotografías de fluorescencia del COC, ovocitos en MII de ratón de 9 meses de edad se observó que contienen células CF desplazadas en un 45% de ellas el 25% presentan el núcleo colapsado, (Figura 10).

En base a estos resultados, en general, se observa que la presencia de fragmentación de ADN en CF no representa que el núcleo se encuentre fragmentado en los ovocitos de los COC.



**Figura 10.** Micrografía de fluorescencia de ovocitos en metafase II de ratón hembra de 9 meses edad que fueron sometidos a una prueba cometa. **A)** Ovocitos que no presentan positivos a la prueba cometa para CF, pero si para núcleo colapsado. **B)** Ovocitos que contienen CF desplazadas. **C)** Ovocitos que dieron positiva la prueba Cometa para el desplazamiento de células foliculares CF y núcleo colapsado.

## DISCUSIÓN.

Los ovarios, en el humano, durante la etapa reproductiva contienen aproximadamente 400 ovocitos que serán liberados, uno por cada ciclo reproductivo, el cual será óptimo para ser fecundado y capaz de reparar al ADN del espermatozoide en un 76% aproximadamente (Flores Pérez, 2005). Pasando esta etapa, en las mujeres se presenta un bajo número de embarazos y en algunos casos anomalías genéticas en los descendientes, de igual forma el porcentaje de reparación de su ADN disminuye (Sakkas & Álvares. 2011), esto puede ser debido posiblemente al aumento de la fragmentación durante el largo tiempo que permanecen en el ovario (desde la pubertad), además, de que al comenzar la menopausia la morfología y las funciones endócrinas cambian en este órgano ( Zamorano *et al.* 2007). El ensayo cometa es un método diseñado para la determinación de fragmentación espermática; en este trabajo se implementó este método para determinar el grado de fragmentación de ADN en ovocitos de ratón hembra de 9 meses de edad (estropausia), de la cepa CD-1, ya que resulta ser una técnica económica, fácil de realizar debido al tipo de material y equipo que utiliza, además de ser un método confiable para determinar la fragmentación del ADN en células individuales como lo sería en este caso en el COC. Esta tecnología se ha aplicado a ovocitos de bovino para medir genotoxicidad (Urrejo, Pareja, Vásquez, & Márquez, 2005), ellos modificaron la técnica de Takahashi *et al.* 2000 en donde los ovocitos fueron sometidos a un tratamiento de lisis con proteinasa K y ácido tirodes además de aumentar el tiempo de corrido electroforético, los autores reportaron una morfología adecuada de un cometa presentando cabeza y cola bien definidas.

Al someter a los COC a la prueba Cometa que implementamos, se encontraron cometas de CF y no se observó claramente la formación del cometa en el ovocito, pero si encontramos el colapso de núcleo. Esto nos indica que posiblemente no se lisaron las membranas celulares y el ADN no quedó expuesto para su desplazamiento durante la electroforesis.

Los resultados encontrados también nos indican que: Los núcleos de las CF del COC en MII de las dos edades estudiadas presentan un alto porcentaje de fragmentación (59% y 45% respectivamente) esto puede ser debido a que no tienen ninguna función en esta etapa y ya no serán requeridas por el ovocito tanto en ratones hembra de 10s y 9m de edad.

Los COC en MII presentaron un alto porcentaje de fragmentación en los núcleos de CF y NC en ratones de 9m (45%, 25% respectivamente), esto es posiblemente porque al ser ovocitos de ratones hembra de edad avanzada se encuentra dañado el ADN debido al tiempo que llevan arrestados en el ovario y dejan de ser ovocitos óptimos para ser fecundados. Por otro lado las CF ya no tienen las mismas funciones que en un ovocito en etapa de maduración citoplasmática ya que los picos de hormonas LH comienzan a decaer paulatinamente y el ovario en esta edad deja de funcionar en cada periodo reproductivo.

Ovocitos primarios de ratones hembra de 10s de edad presentan un alto porcentaje (64%) en NC, el cual disminuye significativamente cuando el ovocito pasa a MII (19%) posiblemente es debido a que durante su maduración pueden sufrir atresia folicular por el daño que presentan en el ADN, esto último puede explicar por qué los ovocitos que se encuentran en una cohorte de dinámica folicular (Gugeon, 1986), solo algunos llegan a MII y representan las células óptimas para esta etapa y el resto se pierden al volverse ovocitos atrésicos. En cuanto a los ovocitos de ratones hembra de 9m el porcentaje de ovocitos primarios con fragmentación en su ADN es de 59% y esto disminuye levemente cuando pasa a ovocito MII en donde presenta un 41%. Esto puede deberse a la disminución paulatina de la liberación de hormonas debido a la estropausia.

El ADN del ovocito posiblemente se encuentre dañado debido a que permanecen “arrestados” gran parte de la vida reproductiva de la mujer, a la fecha no tenemos información del estado del ADN del ovocito que será seleccionado para ser ovulado y en especial en la etapa final de la etapa reproductiva (menopausia), (Sakkas & Álvarez, 2011).



En el futuro, se requiere mejorar esta la técnica para la completa eliminación de las células foliculares y la lisis de la zona pelúcida y la membrana plasmática para así obtener el ADN desnudo para que al ser sometidos a la prueba cometa se logre observar con mayor claridad cometas.

## **CONCLUSIÓN**

Los núcleos de células foliculares de los ovocitos en MII de las dos edades estudiadas presentan un alto porcentaje de fragmentación (59% y 45% respectivamente).

Los ovocitos en MII presentaron un alto porcentaje de fragmentación en los núcleos de células foliculares y núcleos colapsados en ratones de 9m al compararse con el grupo de animales jóvenes posiblemente porque en esta etapa las ratonas entran en un estado de estro proestro.

Ovocitos primarios de ratones hembra de 10 semanas de edad presentan un alto porcentaje (64%) en núcleos colapsados, el cual disminuye significativamente cuando el ovocito pasa a MII (19%).

El porcentaje del colapso de núcleos con CF fragmentadas es bajo de 19 a 25% lo que no puede decirse que es un valor confiable para inferir que los ovocitos están dañado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arabi M. (2004). Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia* 36, 305–31.
- Barratt CL, Aitken RJ, Bjorndahl L, Carrell DT, Lewis SE. *Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications. Hum Reprod.* 2010 Apr;25(4):824-38.
- Benavides and Jean-Louis Guénet.(2003) *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos y Aplicaciones, International Society for Transgenic Technologies (ISTT), Madrid 59-83.*
- Cornejo, G. V. (2009). Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, 115-130.
- Eduardo Zamorano & L. Javier Palomo, *et.al.* (2007). Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España, Tragsa. Madrid 455-457.
- Felicio, L. S., Nelson, J. F., Finch, C. E., (1984). Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biol. Reprod*, 31: pp. 446-453.
- Fleitas Lilibiana (2014). Síndrome de Patau o trisomía 13: reporte del caso. *Rev. Nac.* vol.6 no.2 Itauguá
- Flores Pérez, F. I. (2005). Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovarico. *E-journal*, 87-103.
- Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, *et al.*(2006)Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Human Reprod*, 21:2319-2328
- Gougeon, A. (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human Reprod*, 81-96.
- Horse Erich Konig, Hans-Georg Liebich. (2008). Anatomía de los animales domésticos texto y atlas en color, Medicina Panamericana, Buenos Aires 135-137.
- Jácomen Roca Alfredo. (2005). Fisiología Edocrina. 3° Ediccion. Academia Nacional de Medicina. Bogotá Colombia. 9-185.
- Lugones Botell, M., Quintana Riverón, T. Y., & Cruz Oviedo, Y. (1997). Climaterio y menopausia: importancia de su atención en el nivel primario. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 1-10.

- Michael H.Ross., Wojciech Pawlina.(2009). Histología; texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. Panamericana, Buenos Aires 828-830.
- Menken, J. J. (1986). Age and Infertility. *Science (New York, N.Y.)* 233 (4771), 1389–94.
- Moore, k. L., T.V.N, P., & Mark G, T. (2009). *Embriología Clínica*. Barcelona España: Elsevier España.
- Moore, k. L., T.V.N, P., & Mark G, T. (2014). *Embriología Clínica*. Barcelona España: Elsevier España.
- Nazer H.J, Cifuentes O.L. (2011) Estudio epidemiológico global del síndrome de Down. Revista chilena de pediatría, 82 (2): 105-112.
- Nussbaum, Robert, Roderick R. McInnes, and Huntington F Willard. 2008. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Edited by Saunders. 7th ed.
- OECD. (2014). IN VIVO MAMMALIAN ALKALINE COMET ASSAY. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 1-25.
- Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, et al.(2001). characterization of subtypes of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. Hum Reprod. 20:3101-31108.
- Pellestor, Franck. 2014. "Chromothripsis: How Does Such a Catastrophic Event Impact Human Reproduction?" Human Reproduction (Oxford, England) 29 (3) (March): 388–93. doi:10.1093/humrep/deu003.
- Rubio, M. A. (junio 2012). Regulación neurológica y hormonal de la función reproductora. Fisiología de la pubertad y del climaterio. *Obstetricia y Ginecología* (págs. 1-15). España: Hospital Albacete.
- Sakkas, D., & Álvarez, J. G. (2011). Fragmentación del ADN espermático: mecanismos de origen, repercusión en los resultados reproductivos y análisis\*. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción* , 160-175.
- Sepulveda Angulo M. Teresa, Sabanero López Myrna, Durán Castro Eduardo, Flores Villavicencio Lérica Liss ,Ramírez Emiliano Joel, Silvia Solís Ortíz Martha \*Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado. Acta univercitaria. Guanajuato Vol.22, N 2, 2012.
- Soini, Sirpa, Dolores Ibarreta, Violetta Anastasiadou, Segolene Ayme, Suzanne Braga, Martina Cornel, Domenico Coviello, et al. 2006. "The Interface between Assisted Reproductive Technologies and Genetics: Technical, Social, Ethical and Legal Issues." *European Journal of Human Genetics : EJHG* 14 (5) (May): 588–645. doi:10.1038/sj.ejhg.5201598.

Somma.M, Q. (2005). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimenticias . *europa commission*, 1-12.

Urrejo, R. A., Pareja, A., Vásquez, N. A., & Márquez, M. E. (2005). El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias Vol 18:3*, 222-227.

Villalba Herrera Ericka Wendie, Roca Cruz Carla Atina. (2014). SINDROME DE EDWARDS. Rev. Actualización clínica. Vol. 45,1-5.

## ANEXOS

### Medio Para la Obtención de Ovocitos de Ratón

Chalet, Ziomek, Bavister-Hepes medio  
(CZB-H)

Compuesto	Conc.mM	PM	mg/Lt (500ml) mg
Hepes	20.0	238.30	2383.00
NaCl	81.6	54.44	2221.15
KCl	4.8	74.56	178.93
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.2	246.48	147.89
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	1.7	147.02	124.96
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	136.09	81.65
EDTA.Na <sub>2</sub>	0.1	380.20	19.01
Na Lactato	31.0	112.06	1736.93
NaHCO <sub>3</sub>	5.0	84.01	210.02
Na Piruvato	0.3	110.05	16.51
Polivinil alcohol	0.1mg/ml		50.00
Rojo de fenol	10ug/ml(0.5% en Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS))		2.5
BSA	1mg/ml		0.5
Ph 7.4 preparar con agua doble destilada, filtrar en 0.22µm. Se puede almacenar hasta 1 mes a 4°C. Usar un frasco nuevo para cada experimento.			

**SOLUCIONES PARA ENSAYO COMETA, ESTANDARIZADOS PARA COCs EN OVOCITOS DE RATON.**

**Buffer de Lisis 1L pH 10.**

NaCl	2.5 M	146.1 g
EDTA	100 mM	38.02 g
Tris HCL	10 mM	1576 mg
DMSO	10%	100 ml
DTT	10M	1542 mg
Tritón	1%	10 ml

**Tris 0.4 M 1L pH 7.5**

Tris HCL	0.4 M	75.04 g
----------	-------	---------

**Solución TAE 10X 1L**

Tris	40 Mm	48.4 g
Ácido Acético		11.42 ml
Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O	2 mM	7.44 g
dH <sub>2</sub> O		1L

Nota: Se realizó una dilución 1:10 de TAE 10x para obtener TAE 1x (60 ml TAE 10x en 540 ml de Agua Tridestilada).

**Gel de Agarosa**

PNF	0.4%	400mg
BPF	0.3%	300mg

Se realizaron dos preparaciones una al 0.4% y la otra al 0.3% en 100 ml de agua destilada.

## **COLORANTE**

Anaranjado de acridina (AA)	1mg/ml
-----------------------------	--------

Nota: Disolver 1mg/ml de anaranjado de acridina, una vez que se obtiene esta solución elaborar una disolución 1:50 en dH<sub>2</sub>O para un volumen total de 5 ml (20 ug de AA/ml) para la tinción de CCO de ratón.

## **ABREVIATURA**

Complejo-cumulo Ovocito (COC)  
Ovocitos Primarios (P)  
Ovocitos en Metafase II (nMII)  
Núcleos de células foliculares (nCF)  
Núcleos colapsados (NC)  
10 Semanas (10s)  
9 Meses (9m)  
Hormona leutinizante (LH)  
Hormona folículo estimulante (FSH)  
Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)  
Medio Chalet, Ziomek, Bavister-Hepes (CZB-H)  
Tris, acetate, EDTA (TAE)