



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

“Mecanismos del daño de los compuestos perfluorados PFOS y PFOA en espermatozoides de cerdo *in vitro*”

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M.B.E. Paola Berenice Ortiz Sánchez

DIRECTORA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

ASESORES

DRA. IRMA JIMÉNEZ MORALES

DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

Ciudad de México, a 26 de agosto del 2022.

Créditos del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana es un posgrado multisede, consolidado, orientado a investigación y pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Conacyt con registro 001480.

Jurado de examen de Grado

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM (Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa, Lerma y Xochimilco) aprobó la Tesis que presenta

Paola Berenice Ortiz Sánchez

El día 26 de agosto del 2022

Sinodales

Presidente:

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana



Secretario:

Dra. Irma Jiménez Morales



Vocal:

Dr. Humberto González Márques



Vocal:

Dr. Marco Allan Pérez Solís



Vocal:

Dr. Enrique Othón Hernández González



Comité Tutorial

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dra. Irma Jiménez Morales

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Humberto González Márquez

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Realización y financiamiento

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Andrología y de Expresión Génica de la D.C.B.S. de la UAM-Iztapalapa, y en el del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.

Trabajo financiado por:

CONACYT, México, proyectos CB-284183 a E.O.H.G., 52877-Z/66953 a M.B., 0105961 a R.F.

Beca CONACYT, México a Paola Berenice Ortiz Sánchez número 593020.

IPN

UAM

Agradecimientos

Quiero agradecer ampliamente a los integrantes del laboratorio de andrología de la Universidad Autónoma Metropolitana, por el apoyo y la facilidad de la realización de este proyecto. A mi directora la doctora Reyna C. Fierro Pastrana porque a pesar de todas las circunstancias, siempre luchó porque el proyecto no se detuviera y siguiera adelante. Cuando creíamos que no podíamos avanzar más ante la pérdida de nuestro laboratorio desde el sismo del 2017 y ante la suspensión de actividades con pandemia del 2020, usted siempre estuvo al tanto de que pudieramos seguir adelante. A mis asesores la Dra. Irma Jiménez Morales y el Dr. Humberto González Márquez porque fueron pieza clave para la investigación y mi desarrollo personal. Los tres me formaron y me guiaron de la manera más profesional no sólo como estudiante de doctorado, también como persona al transmitirme sus valores. Se convirtieron en mi familia académica. Las dificultades nos llevaron a realizar una excelente colaboración con los doctores Enrique Othón Hernández González y la Dra. Ana Roa Espitia del laboratorio de biología celular del centro de investigación y estudios avanzados del IPN (CINVESTAV) a quienes quiero agradecer por acojarme y adoptarme en su grupo de trabajo, también agradezco a todos los integrantes de su laboratorio por todas sus enseñanzas durante mi estancia. Al doctor Marco Allan Pérez Solís por aceptar ser miembro de mi jurado. A la Dra. Aideé López quien me enseñó tanto en el laboratorio. Al doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud por aceptarme en su excelente programa de estudios y al conacyt por otorgarme el apoyo y la beca que permitió que se lograra este proyecto.

Dedicatorias

No se puede empezar este apartado de otra manera más que mencionar a mis queridos padres Ma. de Lourdes Sánchez Reyna y Pablo Ortiz Escalante. Ambos me han enseñado tanto de la vida. Mi mamá es una guerrera que siempre me tomó de la mano, desde que me preguntaba los cuestionarios de escuela primaria para estudiar para mis exámenes, me llevó a mis exámenes de admisión a la universidad, se desvelaba conmigo escuchándome repasar y hoy está aquí viéndome convertirme en doctora. Mi mamá es el claro ejemplo de una mujer que a pesar de las circunstancias se atreve a caminar hacia adelante viendo siempre por la vida, por supuesto mi más grande ejemplo. A mi padre, que me enseñó a leer desde el kínder y me otorgó siempre la confianza de que yo podía todo y ese gusto por el estudio, me enseñó el valor del conocimiento en la vida y me enseñó la vida. A mi hermana Griselda, porque no hay mejor maestra educativa para sus alumnos y maestra de vida para su familia con la dedicación y ejemplo que siempre da, licenciada en lenguas extranjeras. A mi hermanita Marifer porque tu llegada a nuestra vida llenó el espacio que necesitábamos para ser una familia completa y feliz, tan sólo tu presencia me brilla. A mis sobrinos Fer y Dany, ¿qué puedo decir de ustedes?, que también son mi mundo y cada que me falta motivación están en mis pensamientos. Sin verlos crecer mi vida hubiera sido diferente. Gracias Alfredo Almendárez por cuidar de mi familia y por ser parte de ella. A Santiago de Jesús Martínez Ávila porque tu llegada le dió vida y color a todos mis sueños futuros, tu apoyo ha sido incondicional. A todos mis amigos de San Luis y CDMX porque me han regalando el tesoro más valioso del universo que es una amistad verdadera de almas bonitas. A mi familia académica, los doctores y compañeros Leslye, Oscar y demás alumnitos porque por ustedes mis días de trabajo no son de trabajo, son tan bonitos y llenos de retos. Soy tan afortunada y el día que me toque partir de este mundo volteraré a ver un día como hoy de agosto 2022 y recordaré que lo tenía todo. Mi yo del futuro te recuerdo que soy muy feliz. Gracias a todos ustedes por ser parte de este gran sueño.

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras de las PFAS: PFOS y PFOA.....	8
Figura 2. Estructura del espermatozoide de mamífero. El espermatozoide está conformado principalmente por la cabeza y el flagelo. El flagelo se divide en pieza media, principal y terminal. En la figura se puede apreciar cada uno de los elementos que lo conforman y lo delimitan (Modificado de Jack, 2022).....	11
Figura 3. Representación esquemática del sistema flagelar. A) Estructura general del espermatozoide conformado principalmente por pieza media, pieza principal y pieza terminal; se muestra la pieza conectora y el anillo de Jensen. B) Segmento flagelar de la pieza media conformado por la vaina mitocondrial, vaina fibrosa, fibras densas externas y axonema. C) Segmento flagelar de la pieza principal, desaparece la vaina mitocondrial por ello se reduce el diámetro. D) Desaparecen las fibras densas y la vaina fibrosa por lo que el diámetro del flagelo es aún más pequeño. El axonema se conforma por un par central de microtúbulos que se conectan a los pares externos mediante los brazos radiales. La nexina se encarga de unir cada par externo de microtúbulos. En cada microtúbulo externo se encuentran los brazos de dineína, la proteína motora para el bateo flagelar dependiente de ATP. Tomado y modificado de (Turner 2003).	12
Figura 4. Esquema de la capacitación espermática. Durante el proceso de capacitación ocurre una serie de cambios, entre ellos el intercambio de iones para la activación de sAC y PKA para la fosforilación de proteínas en residuos de Tyr para activar el estado hiperactivado del espermatozoide. También ocurre la hiperpolarización membranar, polimerización de actina, redistribución de microdominios y el eflujo del colesterol, entre otros cambios. Posterior a la capacitación ocurre la reacción acrosomal. 1) Tomado y modificado de: (Bainbridge and Carlson 2019).	14
Figura 5. Esquema de los pasos durante la reacción acrosomal. A) El acrosoma del espermatozoide se encuentra intacto. B) Se fusiona la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática formando fenestras, se lleva a cabo la liberación de enzimas. C) Desaparición del acrosoma, permanecen como residuos las vesículas membranales híbridas compuestas por la MP y la membrana acrosomal. D) Exposición de la membrana acrosomal interna. Tomado y modificado de: Wassarman 1999; Yanagimachi 1994.	16
Figura 6. Ecuación de Nernst.....	17
Figura 7. Microfotografía de aglutinados de espermatozoides formados en presencia de PFOS. Se observó que conforme aumenta la concentración (μM) del tóxico, incrementa el número y tamaño de los aglutinados (40X).....	26
Figura 8. Microfotografía de espermatozoides teñidos con Eosina-Nigrosina. Los espermatozoides teñidos se encuentran muertos, campo claro (40X).	30

Figura 9. Prueba de endosmosis para evaluar integridad membranal. HOS+, membrana intacta sin daño, se caracteriza por presentar la cola enrollada o hinchada debido a que la membrana tiene la capacidad de responder ante una solución hiposmótica. HOS-, membrana con daño, se caracteriza por no presentar cambios en su morfología debido a la falta de capacidad de responder ante una solución hiposmótica. 35

Figura 10. Efecto de PFAS sobre la mortalidad espermática en condiciones de capacitación. Incubación durante 4 h en TALP-Hepes a 38 °C. A) La mortalidad de los espermatozoides aumentó de manera dependiente de la concentración de PFOS, n= 8. B) La mortalidad de los espermatozoides aumentó después de 1500 µM de manera dependiente de la concentración de PFOA n= 3. DMSO y medio no capacitante (MNC) como diluyentes para PFOS y PFOA, respectivamente. La CL50 de PFOS y PFOA fue de 460 µM y 1894 µM, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$), (media ± DE, experimentos independientes duplicados). 39

Figura 11. Efectos de concentraciones subletales de PFAS sobre la mortalidad espermática durante 4 horas en condiciones de capacitación. La capacitación espermática se realizó a 38 °C durante 4 h. Grupo control (sin PFAS), 274 µM PFOS y 950 µM PFOA. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo control incubado en ausencia de PFAS ($p < 0.01$), (media ± DE, n= 3 experimentos independientes duplicados). 41

Figura 12. Efecto de PFOS y PFOA en la capacitación de espermatozoide de cerdo y la reacción acrosomal inducida (RAi) *in vitro* evaluada con CTC. La capacitación se realizó a 38 °C durante 4 h. La RA se indujo con 10 µg/mL de progesterona (P4) a 38 °C durante 20 min después de 4 h de capacitación. A) Patrones CTC/IP: NC: no capacitado; C: capacitado; RA: reacción acrosomal inducida (RAi). Se desecharon las células muertas. B) Proporción de patrón B. C) Proporción de patrón C. Los espermatozoides considerados capacitados fueron CTC positivos con patrón B y RAi positivos con patrón C. *Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo 0 µM de PFAS CC ($p < 0.01$), (media ± DE, n= 3 experimentos independientes y por duplicado). 43

Figura 13. Efecto de PFOS y PFOA en la reacción acrosomal inducida (RAi) *in vitro* evaluada con PNA. A) Patrones FITC-PNA/IP: célula viva con RAi, célula muerta con RAi, célula viva sin RAi y célula muerta sin RAi. B) Proporción del patrón RA vivo de PFOS. C) Proporción del patrón RA vivo de PFOA. *Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo CCAP ($p < 0.01$), (media ± DE, n= 3 experimentos independientes y por duplicado). 44

Figura 14. PFOS y PFOA indujeron un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de cerdo *in vitro*. (A y B) La capacitación de los espermatozoides se realizó a 38 °C durante 1-4 h bajo exposición a los tóxicos. A) Espermatozoides expuestos a PFOS; B) Espermatozoides expuestos a PFOA. Los cuadrados representan el grupo de control, 0 µM de PFAS; los círculos representan PFOS; los triángulos

representan PFOA. La exposición a PFOS produjo un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides NC desde el tiempo 0 h. El PFOA aumentó el $[Ca^{2+}]_i$ a partir de las 3 h. (C-E) A las 3 h, se midieron los niveles durante 600 segundos. Se añadió el ionóforo A23187 a los 500 segundos. C) Grupo de control, espermatozoides capacitados en ausencia de PFAS; D) Espermatozoides capacitados expuestos a PFOS; E) Espermatozoides capacitados expuestos a PFOA. F) Grupo de control, espermatozoides capacitados en ausencia de cualquier estímulo PFAS + de P4. G) Espermatozoides capacitados expuestos al estímulo PFOS + P4. H) Espermatozoides capacitados expuestos a PFOA + estímulo P4 * Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo de control ($p < 0.05$); normalizado (F / F_0) -1; n= 3 experimentos independientes y por duplicado..... 48

Figura 15. PFOS y el PFOA indujeron la desregulación del potencial de membrana (Emv) de los espermatozoides de cerdo *in vitro*. La capacitación espermática se realizó a 38 °C durante 4 h. La Emv se midió durante 600 segundos a 37 °C. A los 100 segundos, se añadió valinomicina para inducir la hiperpolarización de la membrana. A continuación, se añadieron concentraciones crecientes de KCl cada 100 segundos para inducir la despolarización de la membrana. En el grupo de control, la Emv se calculó mediante la ecuación de Nernst. A) Grupo de control sin productos químicos tóxicos; B) Espermatozoides capacitados expuestos a PFOS (274 μ M); C) Espermatozoides capacitados expuestos a PFOA (950 μ M). Ni el PFOS ni el PFOA permitieron la hiperpolarización inducida por valinomicina. Datos normalizados (F / F_0) -1; n= 3 muestras independientes y por duplicado. 50

Figura 16. El PFOS y el PFOA indujeron la disfunción de la MP de los espermatozoides de cerdo. La proporción de la prueba HOS⁻ se evaluó en espermatozoides capacitados y no capacitados, un grupo de control y muestras expuestas a PFOS (274 μ M) y PFOA (950 μ M). Ambos compuestos tóxicos aumentaron los resultados de la prueba HOS⁻ para la membrana disfuncional y no intacta. a-c Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); n= 3 muestras independientes y por duplicado. 52

Figura 17. PFOS y PFOA bloquearon la salida de colesterol de la membrana plasmática en espermatozoides de cerdo. a) Patrones de fluorescencia de filipina (marcador del colesterol) en espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (Cap), capacitados más PFOS y capacitados más PFOA. b) Unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.F.). El grupo Cap disminuyó la fluorescencia con respecto al grupo NC, los grupos con PFOS y PFOA no presentaron disminución con respecto al NC. *El asterisco indica diferencias estadísticas significativas con respecto a los demás grupos ($p < 0.05$); (media \pm DE; n= 3 experimentos independientes y por duplicado)..... 54

Figura 18. Patrones de fluorescencia con UEA-FITC ante la exposición de PFOS y PFOA. Patrones A-C. A) Sin fluorescencia, B) fluorescencia concentrada en la zona apical y en la pieza media del flagelo, C) fluorescencia concentrada en la región ecuatorial y en el flagelo, D) fluorescencia sobre la región acrosomal y en el

flagelo. Control negativo: L-fucosa libre+ lectina UEA. n= 3 experimentos independientes y por duplicado..... 55

Figura 19. Efecto de PFOS y PFOA sobre la redistribución de L-fucosa durante condiciones capacitantes en espermatozoide de cerdo. Después de la capacitación espermática (C CAP), el patrón A incrementa, principalmente a expensas del patrón B, mientras que los patrones C y D se mantienen en muy baja proporción. En presencia de PFOS y PFOA, el patrón A decrece con respecto a los dos grupos control, no capacitados y capacitados, incrementando los patrones C para PFOS y D para PFOA. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$. (*, ▲, ★, ◆) = Diferencias significativas con respecto al grupo control positivo (C CAP)..... 57

Figura 20. Efecto de PFOS y PFOA sobre la distribución de L-fucosa en el espermatozoide de cerdo durante condiciones de inducción de RA. El patrón B decreció cuando los espermatozoides fueron expuestos a PFOS y PFOA. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$. (*) = Diferencias significativas con respecto al grupo control RA (C RA)..... 57

Figura 21. PFOS y PFOA alteraron el reordenamiento de la distribución espacial de los microdominios de la membrana del espermatozoide de cerdo. Los espermatozoides fueron capacitados durante 4 h. Los microdominios se evaluaron mediante localización con flotilina-1. A) Patrones de fluorescencia de flotilina-1. B) Cuantificación de los tres patrones en espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de PFOS (274 μM) y PFOA (950 μM). a, b, c, d Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); (media \pm DE; n = 3 experimentos independientes por duplicado). 60

Figura 22. Controles de flotilina-1 inmunomarcada. a) No capacitado + flotilina-1, fluorescencia distribuida en el acrosoma de la cabeza. b) Capacitado +. Flotilina-1, fluorescencia agrupada en la zona apical de la cabeza (flechas). c) Control negativo: capacitado + flotilina-1 + inhibidor de calpeptina (calpaína); la inhibición evita el reordenamiento de la flotilina en la zona apical de la cabeza. d) Control negativo: capacitado + flotilina-1 sin Ab secundario; ausencia de fluorescencia. e) Control positivo: Espermatozoides de cobayo no capacitados + flotilina-1; fluorescencia dispersa en el acrosoma. f) Control positivo: Espermatozoides de cobayo capacitados + flotilina-1; fluorescencia agrupada en la zona apical de la cabeza..... 61

Figura 23. Patrones de fluorescencia de faloidina en los espermatozoides. Se evaluó la polimerización de la F-actina con colorante faloidina. Los grupos de control capacitados y no capacitados y los espermatozoides capacitados se expusieron a PFOS (274 μM) y PFOA (950 μM). a, b, c Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); (media \pm s.e.m.; n= 3 experimentos independientes y por duplicado)..... 62

Figura 24. El PFOS alteró la distribución espacial de la f-actina. Espermatozoides capacitados por 4 h. Se evaluó la polimerización de la f-actina con colorante faloidina. Ambos PFAS mostraron disminución del patrón 2 en comparación con el grupo control capacitado. C) PFOS y PFOA impidieron la polimerización de membrana de actina-F en la cabeza y la pieza intermedia (patrón 2) en comparación con el control capacitado. a, b, c Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); media \pm DE; n= 3 experimentos independientes y por duplicado..... 63

Figura 25. Modelo propuesto de daño de PFOS y PFOA sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo. A) Capacitación espermática en ausencia de PFAS. Tras el correcto eflujo del colesterol por parte de los aceptores de esteroides como la BSA o HDL se lleva a cabo el transporte equilibrado de Ca^{2+} mediado por los canales Catsper o PMCA4 (bomba de Ca^{2+} ATP asa) y permite que exista un ligero incremento de Ca^{2+}_i fisiológico para que ocurra con éxito la capacitación y la RA. También ocurre la correcta redistribución de moléculas en la membrana necesarias para la señalización durante la capacitación, RA y fertilización. Los MDM marcados con flotilina-1 se distribuyen hacia la zona apical de la cabeza del espermatozoide. L-fucosa, en su mayoría, deja de estar expuesta como parte de su integración en las glicoproteínas de membrana. Hay una correcta polimerización de F-actina en la cabeza del espermatozoide. B) Capacitación espermática en presencia de PFAS. Debido a la literatura, se propone que PFOS y PFOA aumentan el grosor de la bicapa lipídica incrustándose de manera automática y espontánea, generando un efecto de condensación parecido al colesterol. El eflujo del colesterol necesario para la capacitación fue inhibido, por lo que, la membrana se vuelve aún más rígida y menos fluida, posiblemente por el incremento de las EROS por parte de PFOS y a la falta de la actividad de los aceptores de esteroides como las HDL o el BSA. Cuando se intentó inducir el transporte de los iones K^+ y Ca^{2+} mediante valinomicina y el ionóforo A23187, el daño por PFAS provocó que no hubiera un correcto transporte de los iones posiblemente debido a que ninguno de los ionóforos pudo integrarse debido a la rigidez de la membrana. Según nuestros resultados hay presencia de daño y disfunción de la membrana plasmática. Debido a la disrupción membranal, a la falta de un gradiente de concentración, así como, a la liberación de Ca^{2+} desde los compartimientos internos, se presentó una acumulación excesiva de Ca^{2+} intracelular a las 3 h de capacitación. Las PFAS afectaron la conductancia de la membrana lipídica mediada por valinomicina alterando el potencial de membrana. La rigidez en la membrana provoca que las moléculas (glicoproteínas y MDM) no se distribuyan correctamente para su señalización, importante para los procesos de capacitación y RA. Así como, se inhibió la polimerización de F-actina quedando únicamente los monómeros de G-actina..... 74

Índice de tablas

Tabla 1. Antecedentes directos sobre el efecto de PFOS y PFOA.....	26
Tabla 2. Efecto de PFOS y PFOA en el proceso de capacitación <i>in vitro</i> de espermatozoides de cerdo	39
Tabla 3. Comparación de técnicas de tinción con CTC y PNA-FITC para la identificación de la reacción acrosomal en espermatozoides de cerdo	45

Índice

Créditos del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud.....	I
Jurado de examen de Grado.....	II
Comité Tutorial.....	III
Realización y financiamiento.....	IV
Agradecimientos.....	V
<i>Dedicatorias</i>	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	XII
Índice.....	XIII
Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Toxicología reproductiva.....	5
PFOS y PFOA.....	6
Estructura del espermatozoide.....	9
Capacitación espermática.....	13
Reacción acrosomal (RA).....	14
Potencial de membrana de los espermatozoides.....	16

Papel del colesterol en el espermatozoide.....	18
Glicocomponentes en espermatozoides	19
Microdominios de membrana (MDM) en espermatozoides.....	20
Polimerización de actina en espermatozoides	21
Antecedentes	23
Efectos de PFOS y PFOA sobre la fertilidad.....	23
Toxicidad de PFOS y PFOA en el espermatozoide	24
Pregunta de investigación	27
Hipótesis.....	27
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
Métodos.....	29
Obtención del semen y evaluación básica	29
Capacitación de espermatozoides	30
Concentración letal media (LC50) y concentración inhibitoria media de la capacitación (CIC50) de PFOS y PFOA.....	31
Inducción de RA con progesterona (P4)	32
Niveles de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$	33
Medición del potencial de membrana (Emv)	33
Evaluación de integridad membranal	34
Evaluación de colesterol de membrana	35

Reconocimiento de carbohidratos L-fucosa.....	36
Evaluación de la distribución de microdominios de membrana (MDM).....	36
Medición de polimerización de actina.....	37
Análisis estadístico.....	37
CL50 e CIC50 de PFAS en espermatozoides de cerdo durante la capacitación.....	38
Cinética de la mortalidad de espermatozoides expuestos a PFAS durante la capacitación	40
Efecto de PFAS sobre la capacitación y la RAI mediante la evaluación de la tinción con CTC.....	41
Efecto de PFAS sobre la RAI mediante la evaluación de tinción con FITC-PNA.....	42
Efecto de PFOS y PFOA sobre el flujo de calcio intracelular.....	45
Efecto de PFOS y PFOA sobre el potencial de membrana en espermatozoides evaluado por fluorimetría.....	48
Efecto de PFOS y PFOA sobre la integridad membranal durante la capacitación.....	49
El PFOS y el PFOA bloquean la salida de colesterol de la membrana.....	52
Efecto de PFOS y PFOA sobre la distribución de L-fucosa sobre la capacitación y RA....	53
Los PFAS impiden el movimiento y la distribución normales de los MDM.....	58
Efecto de PFOS y PFOA sobre de la remodelación del citoesqueleto de actina.....	61
Discusión.....	64
Conclusiones.....	75
Referencias bibliográficas.....	76

Productos derivados de este trabajo de tesis	82
Congresos nacionales e internacionales:.....	82
Artículo publicado:	82
Participación en artículo de investigación:	82

Resumen

Los espermatozoides sufren un proceso complejo llamado capacitación durante su recorrido en el tracto reproductor femenino. En este proceso ocurre un conjunto de eventos bioquímicos que tienen como fin la fertilización. Algunos compuestos tóxicos pueden interferir en este proceso, incluidos las sustancias perfluoroalquílicas (PFAS) o también llamados compuestos perfluorados (PFCs) como el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Ambos se han enlistado como contaminantes orgánicos persistentes y se encuentran en muchos materiales de uso cotidiano, tienen la capacidad de acumularse en organismos, lo que se ha asociado con problemas de fertilidad. En este estudio nos enfocamos en evaluar los efectos deletéreos de PFOS y PFOA sobre la funcionalidad de los espermatozoides de cerdo y los cambios en la membrana plasmática (MP) durante la capacitación. Identificamos la concentración letal media (CL50) que fue de 460 μM para PFOS y 1894 μM para PFOA, así como, la concentración de inhibición media de la capacitación (CIC50) que fue de 274 μM para PFOS y 1458 μM para PFOA, posicionando a estos dos compuestos en una toxicidad moderada hacia los espermatozoides. Posteriormente, evaluamos el efecto de $\frac{1}{2}$ de la CL50, concentración subletal, sobre los procesos de capacitación y reacción acrosomal (RA), así como, en cambios importantes en la MP durante la capacitación. La proporción de espermatozoides en condiciones capacitantes disminuyó cuando fueron expuestos a PFOS y PFOA, lo que indica que ambos tóxicos generaron daño a nivel celular, lo que no permitió que se llevaran a cabo con éxito ninguno de los dos procesos. Para evaluar los mecanismos

del daño, se analizaron varios parámetros esenciales para la capacitación. El flujo de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ se incrementó de manera inusual a lo que ocurre durante la capacitación fisiológica. Además de que se abatió la entrada de Ca^{2+} inducida mediante la integración de un ionóforo. También se observó que el potencial de membrana (E_{mv}) se alteró ya que no hubo respuesta con la adición de Valinomicina y KCl. Estos resultados nos llevaron a pensar que el daño se produce a nivel membranar, por lo que evaluamos e identificamos que la integridad de la MP se encontraba alterada en un 49 % de los espermatozoides ante la exposición con PFOS y un 47 % para PFOA. Otras alteraciones en la membrana durante la capacitación en presencia de los PFAS estudiados han sido la inhibición de la salida del colesterol que es indispensable para la capacitación espermática y un cambio en la redistribución de la L-fucosa, un residuo de azúcar relevante para la fertilización. Se presentaron cambios en la reorganización de los microdominios de membrana y en la polimerización de actina-F, ambos importantes para la señalización del espermatozoide. Estos resultados indican que PFOS y el PFOA producen daño en la fisiología de los espermatozoides de cerdo, durante la capacitación y la RA debido al daño y a la disfunción presente en la MP.

Abstract

Sperm undergo a complex process called capacitation during their journey through the female reproductive tract. In this process, a set of biochemical events occurs that have the purpose of fertilization. Some toxic compounds can interfere with this process, including perfluoroalkyl substances (PFAS) or also called perfluorinated compounds (PFCs), such as perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA). Both have been listed as persistent organic pollutants and are found in many everyday materials, and they can accumulate in organisms, which has been associated with fertility problems. In this study, we focused on evaluating the deleterious effects of PFOS and PFOA on boar sperm functionality, and plasma membrane (PM) changes during capacitation. We identified the median lethal concentration (LC50), which was 460 μM for PFOS and 1894 μM for PFOA, as well as the median capacitation inhibition concentration (CIC50), which was 274 μM for PFOS and 1458 μM for PFOA, positioning to these two compounds in moderate toxicity towards spermatozoa. Subsequently, we evaluated the effect of $\frac{1}{2}$ of the LC50, sublethal concentration, on the capacitation and acrosomal reaction (AR) processes and essential changes in PM during capacitation. The proportion of spermatozoa in capacitating conditions decreased when they were exposed to PFOS and PFOA, indicating that both toxins caused damage at the cellular level, which did not allow either of the two processes to end successfully. Several parameters essential for capacitation were analyzed to assess the mechanisms of damage. Intracellular calcium flux $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was increased in an unusual way that occurs during physiological capacitation. In addition, the Ca^{2+} influx induced by the integration of an ionophore was abated. It was also observed that

the membrane potential (E_{mv}) was altered since there was no response with the addition of Valinomycin and KCl. These results led us to think damage occurs at the membrane level, so we evaluated and identified that the integrity of the PM was altered in 49 % of the spermatozoa when exposed to PFOS and 47 % to PFOA. Other alterations in the membrane during capacitation in the presence of the PFAS studied were the inhibition of cholesterol efflux, essential for sperm capacitation, as well as a change in the redistribution of L-fucose, a sugar residue relevant for fertilization. There were changes in membrane microdomain reorganization and F-actin polymerization, both important for sperm signaling. These results indicate that PFOS and PFOA damage the physiology of pig spermatozoa during capacitation and AR due to the damage and dysfunction present in the PM.

Introducción

El espermatozoide requiere de tres procesos de maduración para lograr la fertilización. Maduración epididimal, capacitación y reacción acrosomal (RA). Durante la capacitación espermática, ocurre un conjunto de eventos bioquímicos que tienen como consecuencia la preparación para la RA y, finalmente, permitir al espermatozoide fertilizar al óvulo. Algunos compuestos tóxicos pueden interferir en este proceso, incluidos las sustancias perfluoroalquílicas (PFAS) o también llamados compuestos perfluorados (PFCs) como el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Ambos son muy persistentes (United Nations Environment Program (UNEP) 2009) y se encuentran en muchos materiales de uso cotidiano, se acumulan en los organismos, lo que se ha asociado con problemas de fertilidad (Toft *et al.* 2012). En este estudio, nos enfocamos en evaluar los efectos deletéreos de PFOS y PFOA sobre la funcionalidad de los espermatozoides de cerdo y los daños producidos en la membrana plasmática (MP) durante el proceso de capacitación en presencia de las PFAS.

Toxicología reproductiva

La toxicología reproductiva es el estudio de los efectos adversos de las sustancias en los sistemas neuroendocrinos y reproductivos del embrión, el feto, el neonato, los mamíferos prepúberes y los adultos. Un xenobiótico es una sustancia extraña al individuo, se absorbe, distribuye metaboliza y excreta; experimentando generalmente transformaciones bioquímicas. Usualmente, no se produce naturalmente o se espera que no esté dentro del organismo. También, pueden ser sustancias presentes en

concentraciones mucho más altas de lo habitual. Se aplica a compuestos cuya estructura química es poco frecuente o inexistente en la naturaleza ya que, en general, son sintetizados en el laboratorio y utilizados en la industria. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 200 años. Dentro de los xenobióticos se incluyen agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos y físicos y en toxicología reproductiva se conocen como reprotóxicos.

Incluyen insecticidas, herbicidas, surfactantes y muchos otros; su producción se ha incrementado y causan daño al ambiente y a la salud. Los mecanismos por los que un xenobiótico puede generar daño son: muerte celular, interferencia mitótica, alteración en la función de los ácidos nucleicos, inhibición enzimática, falta de sustratos esenciales, fallas en el aporte de energía, genotoxicidad y alteraciones de las membranas celulares (Eriksen *et al.* 2013; Pimentel-González *et al.* 2009).

PFOS y PFOA

Las PFAS son hidrocarburos de 5 a 10 átomos de carbono rodeados por átomos de flúor y un grupo funcional situado en el extremo de la cadena de carbonos. Son anfipáticos y pueden llegar a disminuir la tensión superficial del agua. Su uso comercial es amplio, se pueden encontrar en ropa, detergentes, champú, teflón de utensilios de cocina, alfombras, productos de cuero, alimentos y hasta en el agua potable. El PFOS y el PFOA son muy resistentes a la degradación y pueden acumularse en los seres vivos; la vida media calculada en suero de humano es de 4.8 a 5.4 años para el PFOS y de 3.5 a 3.8 años para el PFOA (media geométrica y aritmética) (Olsen *et al.* 2007). Este tiempo prolongado en los organismos genera un alto impacto en humanos y animales (Fei *et al.* 2009). El carbono y el flúor forman enlaces covalentes C-F muy

estables, lo que les permiten resistir temperaturas altas, así como, las bases o ácidos fuertes, pueden descomponerse muy lentamente tanto en el aire como en el suelo. A pesar de su gran toxicidad, se han producido, utilizado y distribuido por la industria desde 1940. Las PFAS que más se producen son el sulfonato de perfluorohexano y el ácido perfluorononanoico, también conocidos por sus siglas PFOS y PFOA, respectivamente (ATSDR 2015).

En este trabajo se estudiaron PFOS y PFOA, ambos compuestos poseen 8 átomos de carbono, se distribuyen en el ambiente y son extremadamente persistentes ya que se degradan muy lentamente debido a su gran estabilidad (Lau *et al.* 2007; EPA 2012). Bajo condiciones ambientales típicas, la vida media de PFOA en agua es aproximadamente de 41 años y, para PFOS, 92 años (EPA 2012). PFOS es un perfluoroalquil sulfonato, cuya fórmula molecular es $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-SO}_3\text{H}$; PFOA, un perfluoroalquil carboxilato, su fórmula molecular es $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_6\text{-COOH}$. A pesar de que ambos tienen el mismo número de carbonos, difieren en su grupo funcional sulfonato para PFOS y ácido carboxílico para PFOA, así como, en el número de átomos de flúor, PFOS tiene 17, mientras que PFOA tiene 15 (Figura 1).

PFOA es un derivado del ácido octanóico, su producción aproximada es de 500 toneladas por año, se absorbe con facilidad en el tracto gastrointestinal y la vía de excreción principal es la orina (Andersen *et al.* 2008). Ambos compuestos se han enlistado como contaminantes orgánicos persistentes por la convención de Estocolmo debido a su bioacumulación, persistencia y toxicidad natural (United Nations Environment Program (UNEP) 2009).

La Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA, siglas en inglés) ha advertido la presencia de PFOS y PFOA en el agua potable (200 ng/L y 400 ng/L respectivamente),

lo que puede comprometer la salud pública (EPA 2012). No hay información reciente acerca de la producción de PFAS, ya que no hay obligación de reportarlos en EUA (Forum 2005); el último reporte de producción de PFAS fue en el 2002 donde se determinó que los volúmenes de producción estaban entre 15,000 - 500,000 libras (6-227 toneladas métricas).

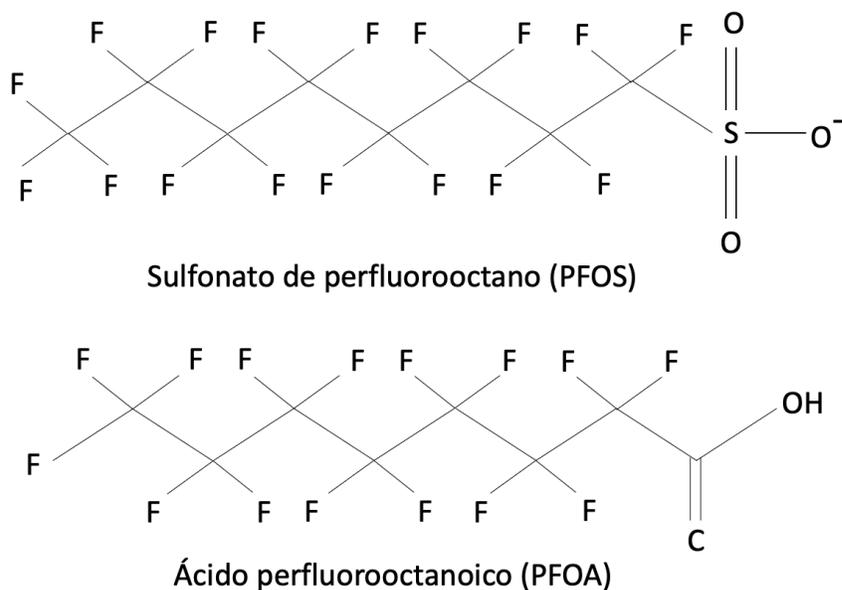


Figura 1. Estructuras de las PFAS: PFOS y PFOA

La producción de PFAS en EUA disminuyó por parte de las fábricas productoras incluyendo a “3M”, que era la empresa con la producción más importante, pero que ya no lo produce, y, a pesar de ello, su persistencia y acumulación resultan detectables en la población (EPA 2012). Sin embargo, en otros países, como México, no hay un control preciso de la producción de PFAS y esto representa un problema de salud pública (ATSDR 2015).

Ambos compuestos tienen una gran afinidad hacia la albúmina y esto conlleva su transporte efectivo en el plasma. Las vías de mayor exposición para PFAS son la ingesta de alimentos contaminados como el pescado, pollo, verduras y frutas; el agua,

la contaminación del aire y contaminación de manos a boca por tener contacto con alfombras tratadas (ATSDR 2015). Se encontró que PFOA induce tumores en hígado y páncreas en roedores (Forum 2005), también se ha observado que PFOA reduce el peso al nacimiento y causa muerte neonatal en ratas (Lau *et al.* 2007). PFOA ha sido relacionado con preclampsia, cáncer de hígado, niveles altos de colesterol, enfermedad de tiroides, colitis, cáncer testicular y disminución en la posibilidad de embarazo en humanos. También, se ha relacionado con un efecto negativo en infantes, afectando su desarrollo del aprendizaje, crecimiento y conducta; tiene un impacto negativo en la efectividad de protección de la inmunidad producida por vacunas. Las PFAS se han relacionado estrechamente con problemas en la salud en diferentes patologías, por lo que pueden estar implicadas en problemas asociados con la reproducción (Anderko y Pennea 2020), específicamente en la calidad espermática.

Estructura del espermatozoide

El espermatozoide está formado por una cabeza y un flagelo; en la cabeza se encuentra el núcleo conformando casi la totalidad de su área. El extremo anterior del núcleo del espermatozoide está cubierto por el acrosoma que consta de una membrana interna y otra externa; es una vesícula secretora que contiene enzimas hidrolíticas necesarias para atravesar las capas externas del óvulo y poder fertilizarlo. El núcleo de la cabeza posee el material genético, ácido desoxirribonucleico (ADN) condensado en el que las histonas son reemplazadas por protaminas durante la espermatogénesis. El flagelo se subdivide en pieza media, pieza principal y pieza terminal (Figura 2). La pieza conectora es la encargada de unir la cabeza con el flagelo, y dentro se encuentra el centriolo proximal, excepto en los roedores. Los complejos de

poro de la envoltura nuclear son empaquetados durante la espermatogénesis formando la envoltura nuclear redundante que se encuentra en la pieza conectora. Originalmente se le ha nombrado redundante debido a que su función es desconocida, sin embargo, se le ha asociado con una participación primordial en la hiperactivación de la movilidad flagelar del espermatozoide, debido que funciona como almacén para el calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ (Ho 2010; Ho y Suarez 2003). En la pieza conectora también inicia el axonema que se extiende hasta la pieza terminal en una conformación 9+2, es decir, 9 pares de microtúbulos periféricos (A+B) y un par de microtúbulos centrales. Los pares de microtúbulos periféricos se unen entre sí mediante la nexina. Los brazos radiales conectan los pares periféricos con el par central. Las dineínas son proteínas encargadas de otorgar el movimiento flagelar. El axonema que emerge desde el cuello del espermatozoide va acompañado, de manera diferente, en cada uno de los tres segmentos, se rodea de fibras densas externas y de la vaina fibrosa en las piezas media y principal; sin embargo, la pieza terminal carece de capas fibrosas. La pieza media del espermatozoide es clave para la movilidad flagelar ya que en ella se encuentran confinadas de 75 a 100 mitocondrias de manera helicoidal aportando el adenosín trifosfato (ATP) necesario para el bateo flagelar que rodean a la fibra densa externa. También aquí se producen las especies reactivas de oxígeno (EROS), que pueden ser radicales libres, por ejemplo, $(O_2^{\cdot-}, HO)$ y especies reactivas de nitrógeno (NOS) como (NO^{\cdot}) o moléculas prooxidantes $(H_2O_2, HONO_2^{\cdot-})$; un desequilibrio en su concentración intracelular puede afectar la calidad y funcionalidad espermática (Sierra Vargas *et al.* 2004). El disco terminal, *annulus* o anillo de Jensen es el final de la pieza media donde comienza la pieza principal, compuesta por la capa fibrosa que

le confiere al espermatozoide soporte y flexibilidad necesarios para su movilidad (Figura 3) (Sutovsky 2006).

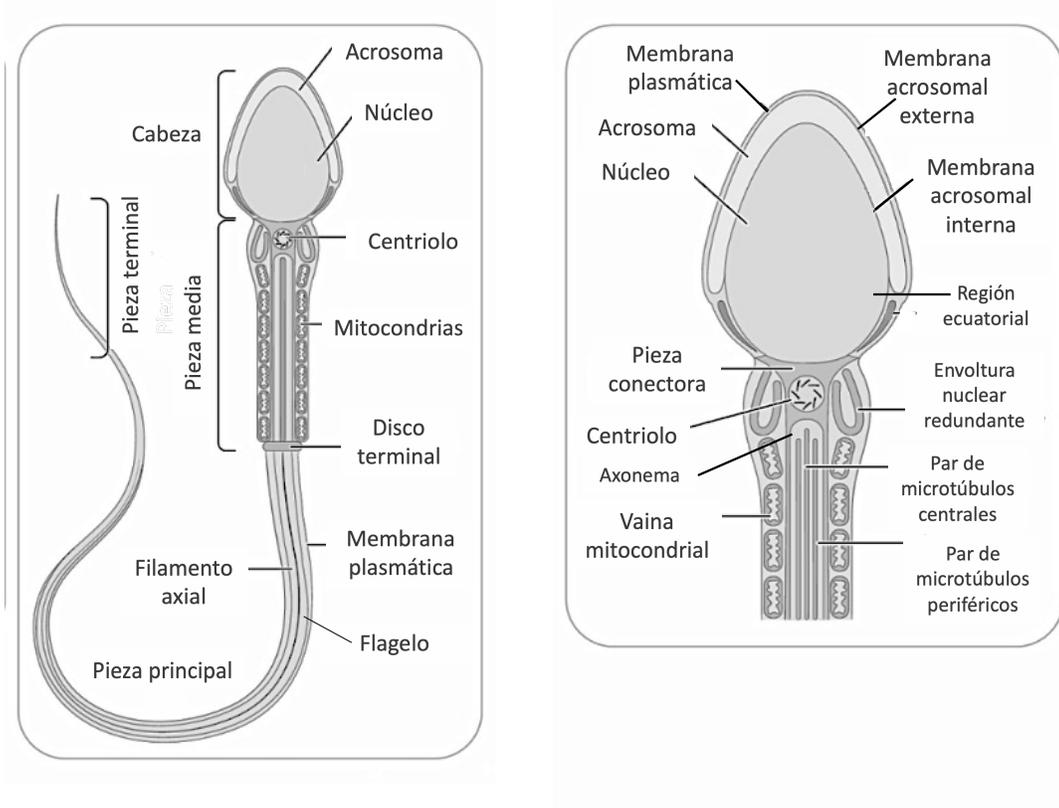


Figura 2. Estructura del espermatozoide de mamífero. El espermatozoide está conformado principalmente por la cabeza y el flagelo. El flagelo se divide en pieza media, principal y terminal. En la figura se puede apreciar cada uno de los elementos que lo conforman y lo delimitan (Modificado de Jack, 2022).

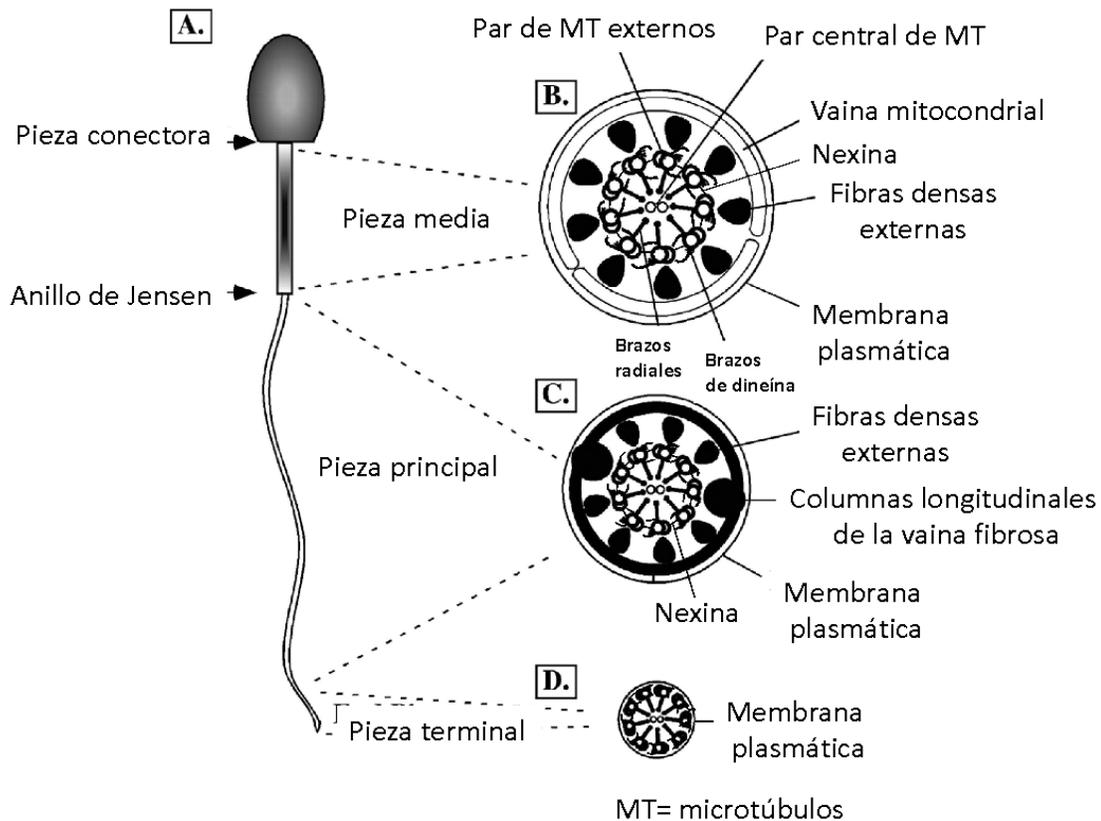


Figura 3. Representación esquemática del sistema flagelar. A) Estructura general del espermatozoide conformado principalmente por pieza media, pieza principal y pieza terminal; se muestra la pieza conectora y el anillo de Jensen. **B)** Segmento flagelar de la pieza media conformado por la vaina mitocondrial, vaina fibrosa, fibras densas externas y axonema. **C)** Segmento flagelar de la pieza principal, desaparece la vaina mitocondrial por ello se reduce el diámetro. **D)** Desaparecen las fibras densas y la vaina fibrosa por lo que el diámetro del flagelo es aún más pequeño. El axonema se conforma por un par central de microtúbulos que se conectan a los pares externos mediante los brazos radiales. La nexina se encarga de unir cada par externo de microtúbulos. En cada microtúbulo externo se encuentran los brazos de dineína, la proteína motora para el bateo flagelar dependiente de ATP. Tomado y modificado de (Turner 2003).

Capacitación espermática

Es necesario que el espermatozoide pase por tres estados de maduración: epididimal, capacitación y RA para poder fertilizar al óvulo (Gadella y Luna 2014). La capacitación espermática implica una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que experimentan los espermatozoides de mamíferos en el oviducto. Estos cambios implican aumento en los iones internos de calcio $[Ca^{2+}]_i$ y bicarbonato (HCO_3^-), que son necesarios para activar la adenilato ciclasa soluble (sAC) que produce adenosina monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc activa la vía de la proteína quinasa A para la fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina, que es esencial para inducir la movilidad hiperactivada (Gadella y Luna 2014).

Durante la capacitación, la membrana plasmática (MP) aumenta su fluidez y su permeabilidad debido a la salida de colesterol, se hiperpolariza y el citoesqueleto de actina se remodela. También hay pérdida, reorganización y/o modificación de fosfolípidos, de los microdominios de membrana (MDM), de las proteínas y glicoproteínas de la MP (Florman y Ducibella 2006). Las mitocondrias generan EROS en los complejos de la cadena respiratoria, principalmente a través de las reacciones de óxido-reducción que ocurren en los complejos de transferencia de electrones y que tienen al oxígeno como el último aceptor de electrones (Harper *et al.* 2004; Murphy 2009). La producción de EROS por el espermatozoide es un proceso fisiológico normal necesario para la salida del colesterol que a su vez es secuestrado por la BSA e importante para la activación de sAC para producir AMPc, un desequilibrio en su generación es perjudicial para las células espermáticas y se ha asociado con infertilidad masculina (Ball, Vo y Baumber 2001). Todo estos cambios tienen la

finalidad de que el espermatozoide pueda encontrarse con el óvulo en las trompas de Falopio y así poder lograr la fertilización (Florman y Ducibella 2006; Visconti *et al.* 1995) (Figura 4).

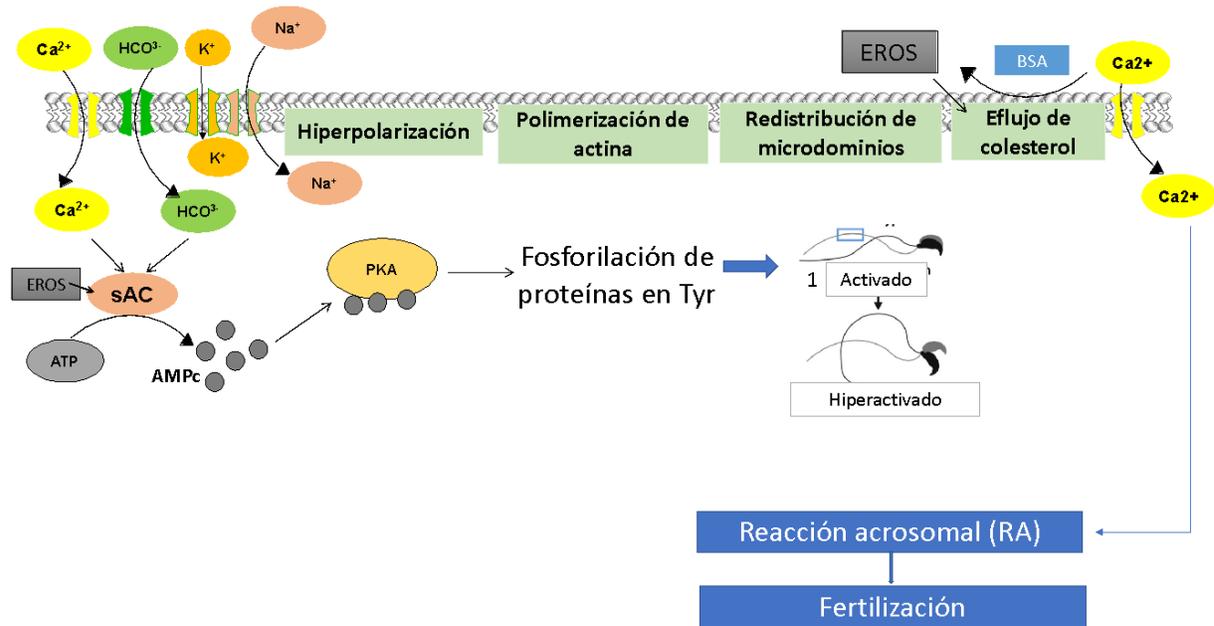


Figura 4. Esquema de la capacitación espermática. Durante el proceso de capacitación ocurre una serie de cambios, entre ellos el intercambio de iones para la activación de sAC y PKA para la fosforilación de proteínas en residuos de Tyr para activar el estado hiperactivado del espermatozoide. También ocurre la hiperpolarización membranal, polimerización de actina, redistribución de microdominios y el eflujo del colesterol, entre otros cambios. Posterior a la capacitación ocurre la reacción acrosomal. 1) Tomado y modificado de: (Bainbridge y Carlson 2019).

Reacción acrosomal (RA)

Durante la espermatogénesis, el acrosoma se forma a partir del aparato de Golgi, se genera una vesícula secretora con un complejo membranal con forma de capuchón en la zona apical de la cabeza del espermatozoide, por debajo de la MP. El acrosoma contiene enzimas capaces de degradar a la zona pelúcida (ZP) del ovocito al ser

liberadas durante la RA (Hirohashi y Yanagimachi 2018). La RA es un proceso que prepara con la capacitación, consiste en cambios fisiológicos que permiten que se fusione la MP del espermatozoide con la membrana acrosomal externa generando fenestras (puntos de fusión entre membranas), en ellas se generan vesículas membranales híbridas para liberar las enzimas hidrolíticas que degradan a la ZP y poder fertilizar al ovocito. Posterior a este proceso, el espermatozoide deja expuesta la membrana acrosomal interna generando una nueva membrana fusogénica (Figura 5) (Florman and Ducibella 2006; Henkel, Franken y Habenicht 1998). La RA fue descrita por primera vez por la investigadora Jean Clark Dan en 1952 en el espermatozoide de erizo tras la invención del microscopio de contraste de fases. Concluyó que para que se logre el proceso de RA se requiere de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Okabe 2016). En presencia de Ca^{2+} , la RA se induce de manera fisiológica o no fisiológica; entre los inductores fisiológicos se encuentran la progesterona y la glicoproteína de la zona pelúcida ZP3; mientras que hay otros inductores no fisiológicos y farmacológicos como el ionóforo A23187, el éster de miristato de forbol (TPA) o análogos del AMPc (Jaiswal, Eisenbach y Tur-Kaspa 1999; Henkel, Franken y Habenicht 1998).

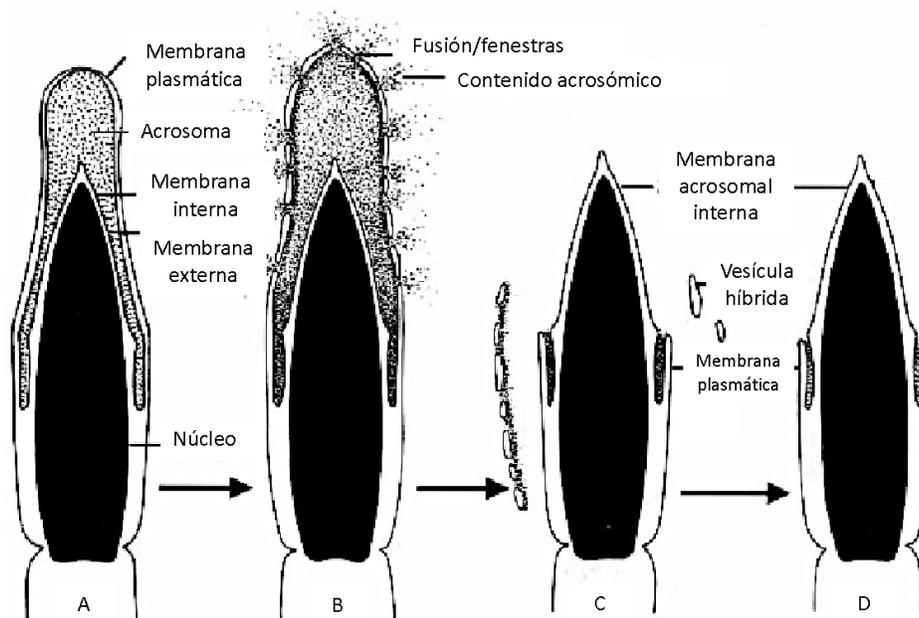


Figura 5. Esquema de los pasos durante la reacción acrosomal. A) El acrosoma del espermatozoide se encuentra intacto. **B)** Se fusiona la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática formando fenestras, se lleva a cabo la liberación de enzimas. **C)** Desaparición del acrosoma, permanecen como residuos las vesículas membranales híbridas compuestas por la MP y la membrana acrosomal. **D)** Exposición de la membrana acrosomal interna. Tomado y modificado de: Wassarman 1999; Yanagimachi 1994.

Potencial de membrana de los espermatozoides

El potencial de membrana (E_{mv}) se define como la diferencia o cambio de potencial eléctrico entre los dos lados de la MP, exterior e interior. Si la diferencia del potencial no es cero significa que existe una separación de las cargas debido al espesor de la MP. El intercambio de iones a través de la membrana es el responsable de esta diferencia de potencial. La duración y el sentido del cambio dependerá del tipo de canales iónicos, cuya actividad será modificada por la señalización. Los iones pasan

por diferentes velocidades y duración generando la separación de cargas. Cuando un ión se encuentra en equilibrio electroquímico se puede calcular su potencial conociendo las concentraciones externas e internas con la ecuación de Nernst (Figura 6). Esta ecuación permite expresar el gradiente de concentración de unión en términos de potencial eléctrico. Si la suma de las corrientes generadas da igual a cero, entonces el potencial de membrana tiene un valor constante, lo que indica que el flujo de iones a través de la MP está equilibrado con el flujo del sentido opuesto, a este estado se le considera el potencial de reposo. De manera fisiológica, las células tienen un potencial de reposo con valores negativos. Se ha observado que, durante la capacitación espermática, ocurre un cambio en el potencial de membrana que se hiperpolariza aproximadamente a <-60 mV, esto permite la activación de los canales tipo T que, posteriormente, son abiertos mediante depolarización. En espermatozoides de cerdo y humano, la inducción de la RA mediante P4 o ZP3 provocan la despolarización membranal que es la responsable de activar los canales de calcio activados por voltaje (Patrat, Serres y Jouannet 2000; Milesi and Mobili 2019; Milesi and Moncada 2019; Zeng, Clark y Florman 1995).

$$E_{eq} = \frac{RT}{ZF} * \ln\left(\frac{[C_{ext}]}{[C_{int}]}\right)$$

R= Constante de los gases (8,31 J/K* mol)

T= Temperatura

Z= Valencia iónica

F= Constante de Faraday

Figura 6. Ecuación de Nernst

Papel del colesterol en el espermatozoide

El colesterol juega un papel muy importante en la MP de las células ya que tiene la capacidad de otorgar un efecto de estabilidad al imponer un orden lipídico en la membrana. Tiene la capacidad de insertarse en los espacios intersticiales de la bicapa lipídica junto a los grupos acilo de los fosfolípidos grasos. Así la MP adquiere orden en sus fosfolípidos, disminuyendo la fluidez de la membrana, reteniendo el movimiento libre de fosfolípidos y proteínas de membrana. Es por esto que los esteroides en la membrana son vitales para las células eucariotas ya que regulan el funcionamiento espacial de complejos proteicos regionalizados como los canales y transportadores. De los esteroides presentes en la MP aproximadamente el 90 % corresponde al colesterol en forma libre (Leahy and Gadella 2015). Existen aceptores del colesterol como la albúmina o proteínas de unión a esteroides como las HDL (Lipoproteínas de alta densidad, siglas en inglés) en el tracto reproductor femenino las cuales permiten el eflujo del colesterol durante la capacitación. El eflujo del colesterol de la MP es indispensable para el logro de la capacitación espermática. Es necesario que la membrana tenga una mejor fluidez para los cambios y reorganización de fosfolípidos, proteínas y azúcares que requiere el espermatozoide durante la capacitación y la preparación para la RA.

En la capacitación *in vitro* se utilizan la albúmina de suero bovino (BSA) o la beta-ciclodextrinas en los medios de capacitación para secuestrar una parte del colesterol de la MP (Choi and Toyoda 1998). Sin embargo, para la correcta salida del colesterol, además de un aceptor del colesterol, se requiere de Ca^{2+} y HCO_3^- para la subsecuente activación de la vía de señalización de AMPc/PKA que ocurre en la capacitación.

Posterior a esta vía, la familia de transporte de ATP SR-BI (scavengers receptors - class, B type 1) media el flujo de HDL para su acción como aceptoras. Por lo tanto, hay dos formas de activación del eflujo del colesterol, mediante esta vía mediada por proteínas aceptoras de HDL y mediante una vía no específica con albúmina. El resultado es un scrambling de los fosfolípidos y una distribución en la desorganización de esteroides y fosfolípidos para permitir la correcta salida del colesterol (Travis and Kopf 2002).

Glicocomponentes en espermatozoides

El glicocálix es un interfaz externa de la célula, compuesto por proteínas y carbohidratos que están en contacto con la matriz extracelular. En el espermatozoide humano hay muchas de proteínas glicosiladas. El espermatozoide posee un glicocálix más delgado que el resto de las células, mientras que el diámetro del glicocálix del ovocito varía entre 1 y 16 μm , el de espermatozoide de cobayo mide de 20-60 nm. Sin embargo, difieren en complejidad ya que la ZP del ovocito contiene únicamente tres proteínas glicosiladas: ZP1, ZP2 y ZP3. (Liu 2016; Schröter *et al.* 1999). Se sabe que el glicocálix se modifica durante la capacitación y la RA y que los carbohidratos son importantes para el reconocimiento, adhesión y fertilización (Vasen *et al.* 2015). Las lectinas son proteínas que reconocen monosacáridos y oligosacáridos con alta especificidad, es por ello por lo que son utilizadas para el estudio de la glicosilación de las proteínas. Las lectinas se conjugan con fluorocromos para analizar la expresión, distribución y alteración de los residuos glicosídicos de los espermatozoides, ya sea en la MP o en el acrosoma (Jiménez *et al.* 2003).

En nuestro laboratorio se encontró que los residuos de N-acetil glucosamina y ácido siálico disminuyen después de la capacitación y la RA, mientras que los residuos de manosa se incrementaron; esto habla de la importancia de dichos carbohidratos en las etapas cruciales previas a la fertilización (Jiménez *et al.* 2003). Las lectinas marcadas con un fluorocromo se utilizan para analizar cambios en la MP de espermatozoides capacitados y con RA, como redistribución o eliminación de residuos de carbohidratos. La unión de L-fucosa a la MP periacrosomal del espermatozoide de bovino sugiere que la L-fucosa, entre otros residuos de carbohidratos, es importante para el reconocimiento de las células epiteliales oviductales y la fertilización del óvulo (Lefebvre, Lo y Suarez 1997). La fluorescencia de los residuos de L-fucosa analizada por citometría de flujo en espermatozoides de cerdo, disminuyó durante la capacitación y la RA con respecto a los no capacitados (Jiménez *et al.* 2002).

Microdominios de membrana (MDM) en espermatozoides

Además de actuar como una barrera semipermeable y aportar estructura y rigidez, la MP tiene la capacidad de que, por medio de sus componentes, regula procesos celulares como el tráfico de moléculas, esto gracias a la formación de regiones localizadas con composiciones y propiedades físicas que son diferentes a los demás sitios membranales. Estas regiones son llamadas MDM, lipid rafts o membranas resistentes a detergentes. En los lipid rafts se encuentran las caveolas, que son microdominios pequeños con apenas 60 nm de diámetro y son ricos en colesterol, al ser tratadas con detergentes no iónicos no se solubilizan y al hacer separación por gradiente de densidad, se encuentran en fracciones de baja densidad. Se les

denomina “balsas” a los segmentos de membrana ricos en colesterol que contienen una gran cantidad de lípidos organizados (Maxfield 2002).

Desde Singer y Nicholson en 1972, se predijo la organización estricta de los lípidos y proteínas en las membranas, sin embargo, se pensaba que la organización era libre de manera rotacional y lateral. Hoy en día se sabe que los lípidos y proteínas tienen una organización de heterogeneidad lateral que les permite una mayor interacción entre moléculas. La alta concentración de colesterol permite un estado de orden líquido con lípidos empaquetados, a diferencia de los demás segmentos que no pertenecen a los microdominios (Laude and Prior 2004).

Polimerización de actina en espermatozoides

El citoesqueleto de actina interviene, de manera importante, en procesos como división celular, contracción muscular, movilidad, control de uniones estrechas, señalización o procesos de endocitosis/exocitosis. La actina es una ATPasa que está presente en las células en forma de actina globular monomérica (G-actina) o como en su forma filamentosa polimérica (F-actina). La actina se despolimeriza o se polimeriza para formar redes de F-actina para facilitar y regular la organización y la dinámica espaciotemporal de las proteínas de unión a actina (Romarowski *et al.* 2016). Se ha identificado, en varias especies, la elongación o agrandamiento de la vacuola acrosomal durante la RA debido a la polimerización de la actina seguida de la liberación del contenido acrosomal (Tilney, Fukui y DeRosier 1987). La polimerización de actina-F es un evento necesario durante la RA y la movilidad flagelar. En espermatozoides de cobayo, se encontraron complejos focales, y que FAK (Focal Adhesion Kinase) activa la integración de vinculina, talina y paxilina al complejo,

durante la capacitación. Al inicio, hay un complejo naciente e inmaduro y a los 90 minutos, el complejo madura. Se concluyó que FAK contribuye a la integridad del acrosoma y regula la polimerización y remodelación de actina; el complejo de adhesión focal de la pieza media puede estar involucrado en la activación de señales relacionadas con la movilidad (Roa-Espitia *et al.* 2016). La despolimerización rápida de F-actina es necesaria para que la RA se lleve a cabo. La actina se pierde después de la exocitosis desprendiéndose de las vesículas membranales híbridas. Al inhibir la polimerización de actina se bloquea la RA inducida por ZP y, por lo tanto, la fertilización (Romarowski *et al.* 2016; Hernández-González *et al.* 2000).

Antecedentes

Efectos de PFOS y PFOA sobre la fertilidad

Estudios en animales y humanos sugieren que las PFAS pueden estar involucradas con la infertilidad (Giesy y Kannan 2001), ya que, en mujeres expuestas a las PFAS, se han encontrado cambios en el ciclo menstrual (Fei *et al.* 2009). El PFOS y el PFOA (Liu, Du y Zhou 2007) son sustancias que alteran el sistema endocrino en seres humanos. La exposición a estos tóxicos altera la homeostasis del estrógeno en el suero del cordón umbilical (Wang *et al.* 2019) y aumenta la testosterona en los hombres (Joensen *et al.* 2013). Las mujeres que esperan más tiempo para quedar embarazadas tienen niveles más altos de ambos compuestos (Fei *et al.* 2009). Se han detectado PFAS en el tracto reproductivo femenino, por ejemplo, estudios independientes del Reino Unido (2015) y Australia (2020) detectaron (0.7-22.4 ng / mL) para PFOS y (2.4-14.5 ng / mL) para PFOA en el líquido folicular de mujeres sometidas a tratamientos de fertilidad. La presencia de PFAS en el líquido folicular no se relacionó directamente con un cambio en la tasa de fertilización con FIV, sin embargo, se relacionó con la presencia de algunos factores de infertilidad femenina como el factor de endometriosis (factor 1), síndrome de ovario poliquístico (factor 2), infecciones del tracto genital (factor 3) y factores idiopáticos (factor 4) (Kim *et al.* 2020; Donley *et al.* 2019). Los espermatozoides con parámetros normales disminuyen en hombres que poseen niveles más altos de PFOS o una combinación de PFOS y PFOA en la sangre, observando que las PFAS perturban y dañan la barrera hemato-testicular por lo cual los espermatozoides quedan expuestos a dichos compuestos (Wan *et al.* 2014).

Toxicidad de PFOS y PFOA en el espermatozoide

Debido a que el espermatozoide de cerdo tiene similitud morfológica y fisiológica significativa con el espermatozoide de humano, es un modelo adecuado para estudios de toxicología reproductiva (Pond y Houpt 1978). Hoy en día, no hay informes suficientes sobre el efecto de la exposición de los espermatozoides a PFAS durante la capacitación. Anteriormente informamos que la exposición a PFOS disminuye la capacidad y la RA, altera la fosforilación de proteínas y aumenta las EROS en los espermatozoides de cerdo (Oseguera-López *et al.* 2020). Sin embargo, el mecanismo por el cual se ve afectada la capacitación, no se ha dilucidado por completo. El PFOS y el PFOA pueden inactivar y destruir células debido al estrés oxidante, el daño del ADN y la alteración de la membrana en *Escherichia coli* (Liu *et al.* 2016). El PFOA se retuvo en la membrana y causó daño a las células HeLa (Peropadre *et al.* 2020), y alteró la movilidad debido a la rotura de la membrana en el esperma humano (Šabović *et al.* 2019).

Los PFAS se acumulan después de la absorción, debido a que se unen a proteínas séricas como la albúmina (Hundley, Sarrif y Kennedy Jr 2006). Así, las PFAS pueden distribuirse y acumularse en muchos tejidos, por lo que pueden ocasionar daño en animales y humanos (Cassone *et al.* 2012). Se han encontrado en tejidos de humanos que han sido a expuestos diariamente a comida, agua y aire contaminados (Prevedouros *et al.* 2006). Se reportó disminución de espermatozoides morfológicamente normales y de la cantidad de espermatozoides en eyaculados de hombres ocupacionalmente expuestos a PFOS (Joensen *et al.* 2009; Toft *et al.* 2012). El PFOS puede encontrarse en leche, hígado, cordón umbilical y en líquido seminal

(Lau *et al.* 2007). Los niveles en sangre de personas ocupacionalmente expuestas a PFOS van de 1.30 a 1.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Alexander y Olsen 2007); se encontró daño del ADN en hombres expuestos a este perfluorado (Joensen *et al.* 2009).

Por otro lado, se determinó que la concentración letal media de PFOS en ovocitos *in vitro* fue de 30 μM , lo cual corresponde a los niveles de exposición laboral; también disminuyó la viabilidad y la integridad del ADN en ovocitos (Silvestre 2014; Campuzano 2014). Otros autores encontraron 4.9 ng/mL de PFOA en personas ocupacionalmente expuestas y con baja concentración espermática en el eyaculado (Joensen *et al.* 2009).

En nuestro laboratorio se determinó, en condiciones *in vitro*, que la concentración letal media de PFOS es 460 μM en espermatozoides expuestos durante el proceso de capacitación. Se observó un aumento en el tamaño y el número de espermatozoides aglutinados, comparado con el grupo control, donde se observaron solo aglutinados pequeños, fenómeno normal en la capacitación (Figura 7). Además, disminuyeron los espermatozoides capacitados y reaccionados, así como su movilidad conforme aumentó la concentración de PFOS, hasta encontrar espermatozoides totalmente inmóviles a 1500 μM (Sánchez 2017b; Oseguera-López *et al.* 2020; Ortiz-Sánchez 2017).

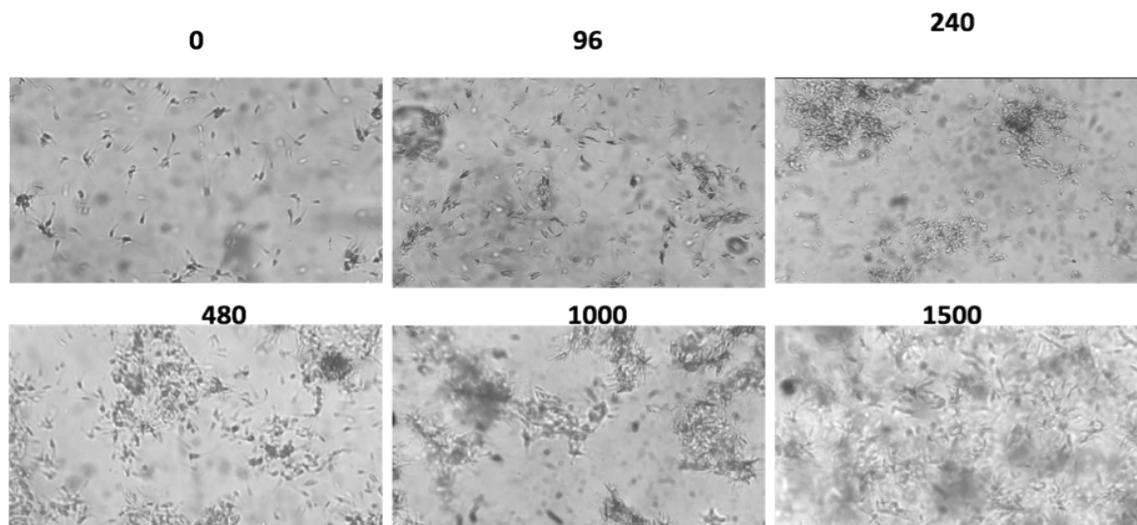


Figura 7. Microfotografía de aglutinados de espermatozoides formados en presencia de PFOS. Se observó que conforme aumenta la concentración (μM) del tóxico, incrementa el número y tamaño de los aglutinados (40X).

En la tabla 1 podemos visualizar un resumen de los efectos de PFOS y PFOA que se han encontrado en algunas células.

Tabla 1. Antecedentes directos sobre el efecto de PFOS y PFOA

Compuesto	Célula	Efecto	Fuente
PFOS y PFOA	<i>E-coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Daño membranal. ● Mortalidad. ● Estrés oxidante. 	(Liu <i>et al.</i> 2016)
PFOA	HeLa	<ul style="list-style-type: none"> ● Daño membranal. ● Se retiene en la membrana. 	(Peropadre <i>et al.</i> 2020)
PFOA	Espermatozoide de humano	<ul style="list-style-type: none"> ● Disminuye la movilidad. ● Daño a membrana. 	(Šabović <i>et al.</i> 2019)
PFOS	Espermatozoide de cerdo	<ul style="list-style-type: none"> ● Disminuye la capacitación y RA. ● Alteración de la fosforilación. ● Aumento de EROS. ● Aumento en la aglutinación. 	(Oseguera-López <i>et al.</i> 2020; Sánchez 2017a; Ortiz-Sánchez 2017)

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los mecanismos del daño que provoca la exposición de espermatozoides de cerdo a PFOS y PFOA *in vitro*?

Hipótesis

Los compuestos perfluorados, por sus características fisicoquímicas, se acumulan en los organismos y pueden llegar hasta los espermatozoides, por lo que se espera que disminuyan las células capacitadas y reaccionadas al ser expuestas a los compuestos perfluorados. También se espera que se genere daño a nivel membranar evitando cambios necesarios para ambos procesos como los niveles de Ca^{2+} , el potencial de membrana, la reorganización de carbohidratos, colesterol y microdominios, y remodelación del citoesqueleto de actina.

Objetivo general

Determinar los mecanismos del daño que provocan los perfluorados en la capacitación de espermatozoides de cerdo *in vitro*.

Objetivos específicos

- 1) Establecer el efecto de PFOS y PFOA en la viabilidad, capacitación y reacción acrosomal (RA) para calcular la concentración letal media (CL50) y la concentración de inhibición de la capacitación media (CI50).
- 2) Determinar el efecto de concentraciones subletales de PFOS y PFOA en:
 - a) El Ca^{2+} unido a proteínas de membrana de espermatozoides capacitados y con RAI.
 - b) La capacidad de los espermatozoides para realizar la reacción acrosomal inducida (RAI).
 - c) El flujo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la capacitación y la RAI.
- 3) Definir el daño de PFOS y PFOA en la membrana de espermatozoides capacitados en cuanto a potencial de membrana, integridad, niveles del colesterol, distribución de carbohidratos y distribución de microdominios.
- 4) Determinar si PFOS y PFOA provocan una remodelación del citoesqueleto de actina en espermatozoides capacitados.

Métodos

Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma Chemical Company (St Louis, Mo) a menos que se indique lo contrario. Se utilizaron microscopios de epifluorescencia (ZEISS, Alemania, y Olympus, BX50) con aumentos de 400X y 600X. Los análisis se realizaron con el software NIS-ELEMENTS AR (V3.1). Se evaluaron al menos doscientos espermatozoides por portaobjetos.

Obtención del semen y evaluación básica

Se utilizaron muestras de 10 cerdos sementales sanos y fértiles de raza Landrace, en edad reproductiva, provenientes de una granja comercial. En el laboratorio se analizó la calidad de las muestras con el fin de utilizar solamente muestras clasificadas como normozoospermicas de acuerdo a criterios ya establecidos (Garner y Hafez 1993). Se determinó la mortalidad, movilidad, número de anomalías y la concentración espermática. La mortalidad y la movilidad deben cumplir $> 80 \%$, anomalías $< 15 \%$ y la concentración $> 2 \times 10^8$ espermatozoides/mL.

La mortalidad de los espermatozoides se determinó por medio de la técnica de Eosina/Nigrosina (E-N): se mezcló una gota de muestra de 5 μ L con 5 μ L de solución de tinción en un portaobjetos a 37 °C bajo microscopía de campo claro (Jiménez *et al.* 2003; Björndahl, Söderlund y Kvist 2003). Se consideraron como espermatozoides vivos aquéllos que no presentaron tinción y muertos los teñidos en color rosa a rojo (Figura 8). Con los mismos frotis se determinó el porcentaje total de espermatozoides con anomalías morfológicas. La movilidad se determinó por microscopía óptica a 40X y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles. La concentración se

determinó mediante conteo al microscopio a 10X en una cámara de Neubauer. Para todos los parámetros, se analizaron 200 espermatozoides por muestra (Jiménez *et al.* 2003).



Figura 8. Microfotografía de espermatozoides teñidos con Eosina-Nigrosina. Los espermatozoides teñidos se encuentran muertos, campo claro (40X).

Capacitación de espermatozoides

Las muestras se lavaron dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) para eliminar el plasma seminal mediante centrifugación a 600 x g durante 5 min. Para la capacitación, se colocaron 5×10^6 espermatozoides en una placa de cultivo de cuatro pozos con 1000 μ L de TALP-HEPES (KCl 3.1 mM, NaCl 100 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.29 mM, Hepes 10 mM, NaHCO_3 2.5 mM, lactato de sodio 21.6 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mM y rojo de fenol 10 μ g/mL como indicador de pH) a pH 7.4. Se suplementó el día de uso con 6 mg/mL BSA fracción V y 1 mM de piruvato de sodio. Se incubó durante 4 h a 38 °C en atmósfera húmeda con 5 % (v/v) de CO_2 para lograr la capacitación espermática. Como control no capacitado (NC), los espermatozoides

se incubaron durante 10 min en un MNC sin suplementar. Las células se tiñeron después de la capacitación con 0.5 mg/mL de yoduro de propidio (PI) durante 8 minutos a 37 °C para descartar las células muertas (Celeghini *et al.* 2010). La capacitación se evaluó mediante tinción con CTC. En cada caso, los espermatozoides se fijaron con 5 µL de glutaraldehído al 0.2 % en tampón Tris 0.5 M, pH 7.4, luego se mezclaron 5 µL de espermatozoides con 5 µL de tampón CTC 750 µM. Las muestras se colocaron en portaobjetos con Gelvatol y se cubrieron con cubreobjetos. Las muestras se observaron bajo epifluorescencia UV de 495 nm. Solo se utilizaron las muestras que contenían más del 60 % de espermatozoides capacitados (Jiménez *et al.* 2006; Ward y Storey 1984). Los patrones de fluorescencia de CTC se determinaron de la siguiente manera: NC, no capacitado, fluorescencia en toda la cabeza del espermatozoide; C, capacitado, fluorescencia intensa en la zona ecuatorial y acrosomal; RA, reaccionado, fluorescencia en la zona ecuatorial y, en algunos casos, post-ecuatorial (Figura 12A) (Oseguera-López *et al.* 2020). Se cuantificaron 200 espermatozoides y se determinó la proporción de células capacitadas y no capacitadas con y sin los tóxicos PFOS y PFOA (Figura 12B).

Concentración letal media (LC50) y concentración inhibitoria media de la capacitación (CIC50) de PFOS y PFOA.

Los espermatozoides se incubaron en medio de capacitación (MC) con un amplio rango de PFAS, aumentando las concentraciones hasta alcanzar la máxima mortalidad, para calcular CL50: 1000, 1500, 3000 µM para PFOS, y 500, 1000, 1500, 2000, 2500 µM para PFOA. El MC (0 µM de PFAS) se usó como control. Como control negativo, los espermatozoides se incubaron en MC durante 4 h solo con los diluyentes de las PFAS (DMSO para PFOS, y medio no capacitante (NCM) para PFOA). La

mortalidad de espermatozoides se evaluó mediante tinción E-N. La CL50 se determinó mediante la prueba Probit.

Los espermatozoides se incubaron en condiciones de capacitación con concentraciones crecientes de 500, 1000, 2000 y 3000 μM de PFOS y PFOA, y la capacitación se evaluó mediante la tinción con clortetraciclina (CTC). La CIC50 se determinó mediante la prueba Probit. Las concentraciones de PFOS CIC50 y PFOA $\frac{1}{2}$ LC50 se utilizaron para los análisis posteriores. Los controles sin PFAS y diluyentes se realizaron en paralelo como controles negativos.

Inducción de RA con progesterona (P4)

Después de las 4 h de capacitación, los espermatozoides se incubaron con 10 $\mu\text{g/mL}$ de P4 durante 20 minutos además de las 4 h de capacitación (Wu, Chiang y Cheng 2006). Posteriormente las células se tiñeron después de la capacitación con PI, para descartar las células muertas. Los espermatozoides se fijaron, se tiñeron con CTC, se lavaron y se observaron como se describió anteriormente (Figura 12C).

La lectina derivada del maní *Arachis hypogaea* PNA (peanut agglutinin) conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se utilizó como técnica alternativa para medir la reacción acrosomal inducida (RAi). Se colocaron alícuotas de 20 μL en portaobjetos y se dejaron secar al aire durante la noche a temperatura ambiente (TA). A continuación, los portaobjetos se sumergieron durante 30 segundos en metanol al 100 %. Después de cambiar dos veces el PBS, las células se incubaron con 20 μL para quedar a una concentración final de 15 $\mu\text{g/mL}$ de FITC-PNA durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda. Los portaobjetos se lavaron, se montaron con Gelvatol, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron. Los patrones de fluorescencia se observaron bajo un

microscopio de epifluorescencia a una longitud de onda de excitación/emisión FITC-PNA 488/515 nm. Las células se tiñeron con PI después de la inducción de RA para descartar las células muertas, como se describió anteriormente (Figura 13A).

Niveles de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$

Una alícuota de 4×10^6 espermatozoides capacitados/mL se colocó con Fluo-3 AM 1 mM durante 30 min a 38 °C en la oscuridad. Después de lavar para eliminar el exceso de tinción, se midieron los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ con el espectrofluorómetro LS 55 usando el software FL WINLAB (Perkin Elmer, EE. UU.) con una emisión de 490 nm y longitudes de onda de absorción de 520 nm. En primer lugar, se determinaron los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y de los espermatozoides expuestos a CIC50 PFOS y PFOA $\frac{1}{2}$ CL50 cada hora de 0 a 4 h de capacitación. A continuación, se midieron los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ durante 600 segundos después de la capacitación. Además, los espermatozoides expuestos a CIC50 PFOS y PFOA $\frac{1}{2}$ LC50 se estimularon durante la medición de $[Ca^{2+}]_i$ después de la capacitación con 10 μ g de P4 en el segundo 300. En todas las medidas, se agregaron 10 μ M de ionóforo A23187 en el segundo 500 como control positivo. Los controles en diluyentes sin PFAS se realizaron en paralelo. Los datos de fluorescencia se normalizaron usando la ecuación $(F/F_0)-1$, donde F es la fluorescencia en un momento dado y F_0 es la fluorescencia basal media de los primeros 30 segundos de medición (Mata-Martínez *et al.* 2013).

Medición del potencial de membrana (Emv)

Una concentración de 4×10^6 espermatozoides/mL se capacitaron en MC. Al final del proceso de capacitación se colocó yoduro de 3,3'-Di-n-propiltiadicarbocianina,

DISC3(5) (Invitrogen #cat: D306) para quedar a una concentración final de 1 μ M. Se incubó durante 3 min en una cubeta en agitación a 37°C en atmósfera húmeda y en oscuridad que se encuentra integrada al espectrofluorómetro Perkin Elmer LS 55. El Emv se registró en tiempo real durante 600 segundos mediante espectrofluorometría bajo un espectro de emisión de 675 nm y un espectro de absorción de 651 nm. Durante el registro, se añadió valinomicina (un ionóforo de K⁺) a 0.5 M en el segundo 100 para calibrar la Emv, cuya función es el transporte de iones de K⁺, posteriormente, se añadieron concentraciones crecientes (0.5, 1, 2 y 2 M) cada 100 segundos para bloquear la hiperpolarización, inducir la repolarización y así determinar la Emv después de cada adición. Los datos de fluorescencia se normalizaron utilizando la ecuación $(F/F_0)-1$. Emv se calculó utilizando la ecuación de Nernst descrita con anterioridad (Demarco *et al.* 2003; Šichtař *et al.* 2019; De La Vega-Beltran *et al.* 2012).

Evaluación de integridad membranar

La funcionalidad de la membrana espermática se evaluó mediante la prueba de solución hiposmótica (prueba HOS), según (Šichtař *et al.* 2019) con modificaciones. Se mezcló una alícuota de 50 μ L de muestra capacitada (~ 200.000 espermatozoides) con 1 mL de 100 mOsm de citrato de sodio y se incubó durante 30 min a 37 °C. Se fijó inmediatamente en formaldehído al 3 % (v / v) más glutaraldehído al 0.2 % (v / v). El enrollamiento y la hinchazón en el flagelo (HOS +) indicaron MP funcional intacta; su ausencia indicó que la MP no estaba intacta (HOS-) (Figura 9).

Evaluación de colesterol de membrana

Se utilizó filipina para analizar los niveles de colesterol en la MP. Después de la capacitación, los espermatozoides se lavaron con PBS y se fijaron, como se indicó anteriormente.

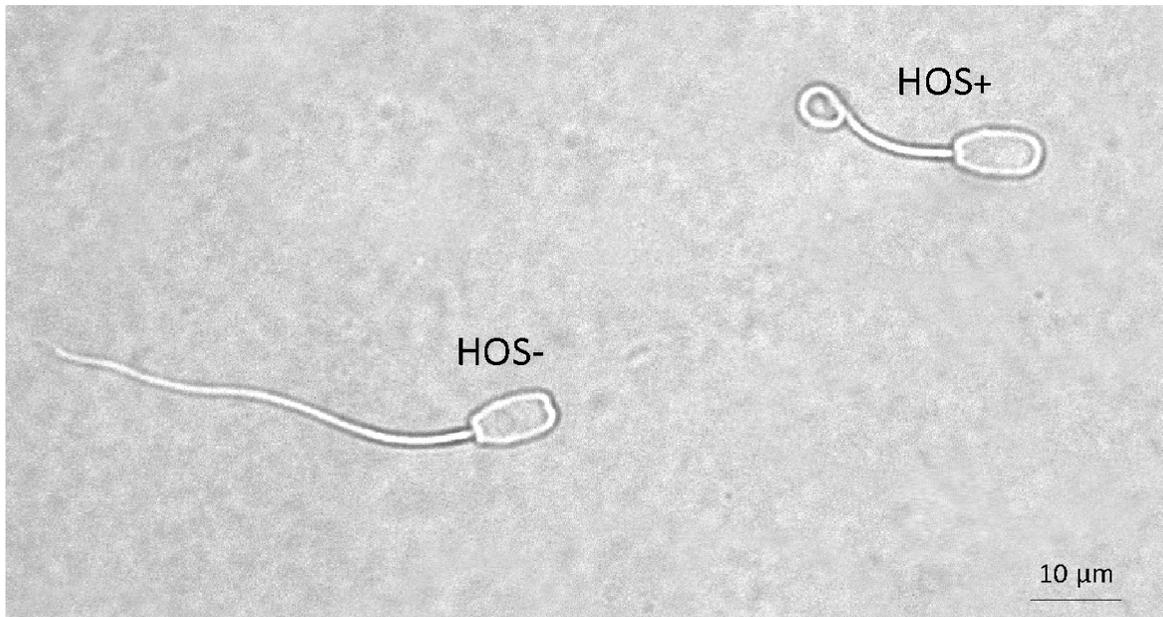


Figura 9. Prueba de endosmosis para evaluar integridad membranal. HOS+, membrana intacta sin daño, se caracteriza por presentar la cola enrollada o hinchada debido a que la membrana tiene la capacidad de responder ante una solución hiposmótica. HOS-, membrana con daño, se caracteriza por no presentar cambios en su morfología debido a la falta de capacidad de responder ante una solución hiposmótica.

Después de 1 h, las células se recolectaron por centrifugación durante 3 min a 600 x g. Los espermatozoides se lavaron en agua destilada, se colocaron alícuotas de 20×10^6 células / mL en portaobjetos y se dejaron secar al aire durante la noche a TA. Después de tres cambios de PBS, las células se incubaron con 25 μ g / mL de filipina durante 1 h a 37 °C. Los portaobjetos se lavaron cinco veces con PBS, y se montaron con Gelvatol y se sellaron con esmalte. Los patrones y niveles de fluorescencia de filipina

se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia (longitudes de onda de emisión de 675 nm y de absorción de 651 nm). Las Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (U.A.F.) se determinaron cuantificando la intensidad de fluorescencia media (píxeles por área seleccionada). El área de medición seleccionada fue la cabeza y la pieza central (Khalil *et al.* 2006).

Reconocimiento de carbohidratos L-fucosa.

Alícuotas de 10×10^6 espermatozoides/mL se incubaron con 5 μ L de la lectina UEA conjugada con FITC (dilución 1:50 con PBS, 0.1 % BSA) durante 30 min a 37 °C, se lavaron los espermatozoides por centrifugación 600 g x 5 min. Se fijaron con 1 % de paraformaldehído. La proporción de los espermatozoides y la distribución de la fluorescencia se analizó mediante microscopía de fluorescencia (Jiménez *et al.* 2003).

Evaluación de la distribución de microdominios de membrana (MDM).

La flotilina-1 se utilizó como marcador de los MDM. Los espermatozoides se fijaron como se describe anteriormente y se lavaron en agua destilada. Se colocaron alícuotas de 20×10^6 células/mL en portaobjetos y se dejaron secar durante la noche. Los espermatozoides secos se permeabilizaron con PBS-Tritón al 1 % durante 20 min. Después de tres cambios de PBS, se incubaron durante la noche a TA con el anticuerpo primario anti-flotilina (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, #cat: sc-13313.) en dilución de bloqueo (BSA al 1 % en PBS) a TA. A continuación, los portaobjetos se lavaron y se incubaron durante 2 horas a 37 °C con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (1:50), se lavaron y se analizaron como se describió anteriormente.

Medición de polimerización de actina

Para determinar si se altera la reorganización del citoesqueleto en los espermatozoides expuestos a las PFAS. Se analizó la redistribución de F-actina en el espermatozoide. Se permeabilizó el espermatozoide con acetona a 20 °C durante 7 minutos y se lavaron con PBS. Se identificó F-actina usando TRITC-faloidina a TA durante una hora. Se colocó la muestra en un portaobjetos, se lavó, se selló y se observó en microscopio de epifluorescencia y contraste de fases (Roa-Espitia *et al.* 2016).

Análisis estadístico

Cada parámetro se analizó con la prueba estadística ANOVA seguida de una prueba de TUKEY para evaluar si existen diferencias significativas entre grupos experimentales, así como entre grupos control y los grupos experimentales. Para corroborar significancia en algunos casos se realizó T- Student para comparar dos grupos específicos. Se utilizó una n= 3 como mínimo y se consideró una $p < 0.05$ para establecer la significancia.

CL50 e CIC50 de PFAS en espermatozoides de cerdo durante la capacitación

Los PFAS mostraron un efecto letal dependiente de la concentración sobre los espermatozoides. Para PFOS, la mortalidad fue del 64 % a 1000 μM y alcanzó el 97 % a 3000 μM (Figura 10A), mientras que para PFOA fue del 36 % a 1500 μM y del 76.5 % a 2500 μM (Figura 10B). No se observó ningún efecto citotóxico con los diluyentes de PFAS, por lo que no se mencionan en la descripción de los experimentos posteriores. Según el análisis Probit, la LC50 para PFOS y PFOA fue de 460 y 1894 μM , respectivamente.

El efecto de las PFAS en la capacitación se determinó mediante tinción con CTC del patrón B para calcular la CIC50 (Tabla 2). El proceso de capacitación se modificó de manera dependiente de la concentración del perfluorado. La proporción de espermatozoides capacitados fue significativamente menor en presencia de PFOA 1000 μM , que en el control (Tabla 2).

El CIC50 de PFOS y PFOA fue de 274 μM y 1458 μM , respectivamente. Si bien ambas sustancias tóxicas afectaron la capacitación de los espermatozoides, el efecto del PFOS fue mayor que el del PFOA.

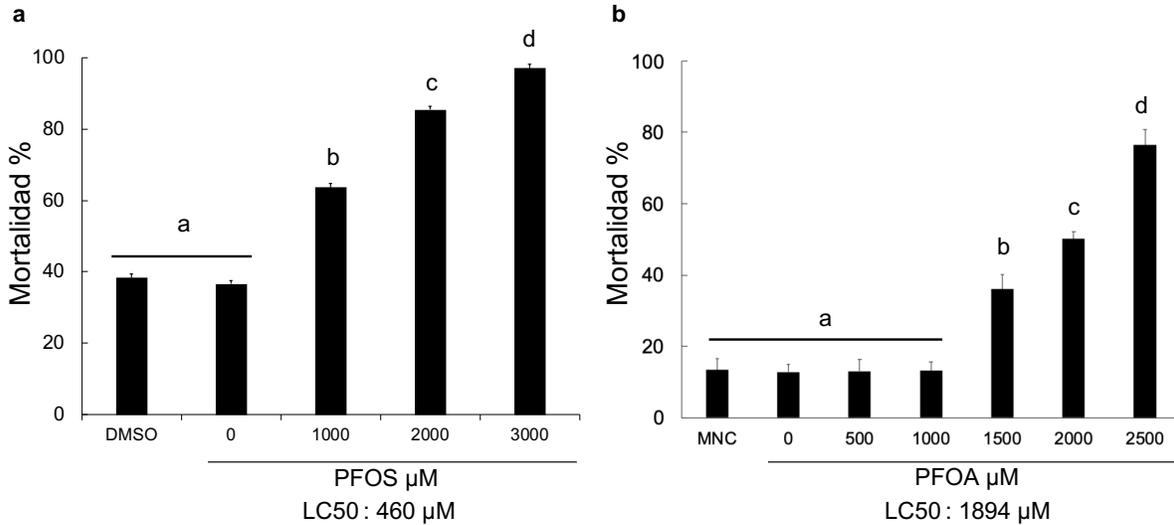


Figura 10. Efecto de PFAS sobre la mortalidad espermática en condiciones de capacitación. Incubación durante 4 h en TALP-Hepes a 38 °C. A) La mortalidad de los espermatozoides aumentó de manera dependiente de la concentración de PFOS, n= 8. **B)** La mortalidad de los espermatozoides aumentó después de 1500 µM de manera dependiente de la concentración de PFOA n= 3. DMSO y medio no capacitante (MNC) como diluyentes para PFOS y PFOA, respectivamente. La CL50 de PFOS y PFOA fue de 460 µM y 1894 µM, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$), (media \pm DE, experimentos independientes duplicados).

Tabla 2. Efecto de PFOS y PFOA en el proceso de capacitación *in vitro* de espermatozoides de cerdo

PFAS	Espermatozoides capacitados (%) \pm DE					
	Vehículo	Concentración (µM)				
		0	500	1000	2000	3000
PFOS	64.30 \pm 3.42 ^a	65.20 \pm 5.22 ^a	44.8 \pm 3.42 ^b	21.00 \pm 1.12 ^c	15.30 \pm 2.74 ^{df}	9.34 \pm 2.29 ^f
PFOA	64.80 \pm 3.55 ^a	66.30 \pm 6.20 ^a	65.50 \pm 5.43 ^a	43.30 \pm 2.20 ^b	49.50 \pm 1.12 ^b	33.70 \pm 1.35 ^c

La capacitación espermática se realizó a 38 °C durante 4 h. Tratamientos: grupo control (sin PFAS), 500-3000 µM de PFOS, y PFOA, diluyentes (DMSO para PFOS y medio no capacitante para PFOA). El CIC50 de PFOS y PFOA fue de 274 µM y

1458 μM , respectivamente. **a-e** Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), (media \pm DE, $n = 3$ experimentos independientes por duplicado). La determinación de la CIC50 es un paso trascendental en la investigación de los mecanismos involucrados en el daño producido por PFAS durante el proceso de capacitación. En los experimentos posteriores, empleamos 274 μM de PFOS (CIC50) y 950 μM de PFOA ($\frac{1}{2}$ LC50). La razón para no usar la CIC50 de PFOA (1458 μM) fue que el valor es muy cercano al de su LC50 (1894 μM). El uso de la concentración subletal permite el estudio adecuado de los mecanismos de toxicidad de un compuesto; $\frac{1}{2}$ de CL50 de PFOS (230 μM) fue muy similar a la CIC50 (274 μM) utilizada en los ensayos posteriores.

Cinética de la mortalidad de espermatozoides expuestos a PFAS durante la capacitación

Al evaluar la mortalidad en una cinética de 4 h de la capacitación en presencia de PFOS (274 μM) y PFOA (950 μM) la mortalidad basal del control se mantuvo constante durante las 4 h a un nivel de 9.83-15.33 %. El PFOA no mostró toxicidad en los espermatozoides, ya que la mortalidad se mantuvo similar a la del control. En el caso del PFOS, la mortalidad aumentó significativamente (20 %) desde el tiempo 0 h respecto al control, y alcanzó el 33 % a las 4 h de incubación. Pareciera que la hora cero posee más mortalidad que la hora uno con PFOA, sin embargo, no hay diferencias significativas entre ambos tiempos. Estos resultados indican que el PFOS es muy tóxico para los espermatozoides, ya que la mortalidad aumentó desde el inicio del procedimiento (Figura 11).

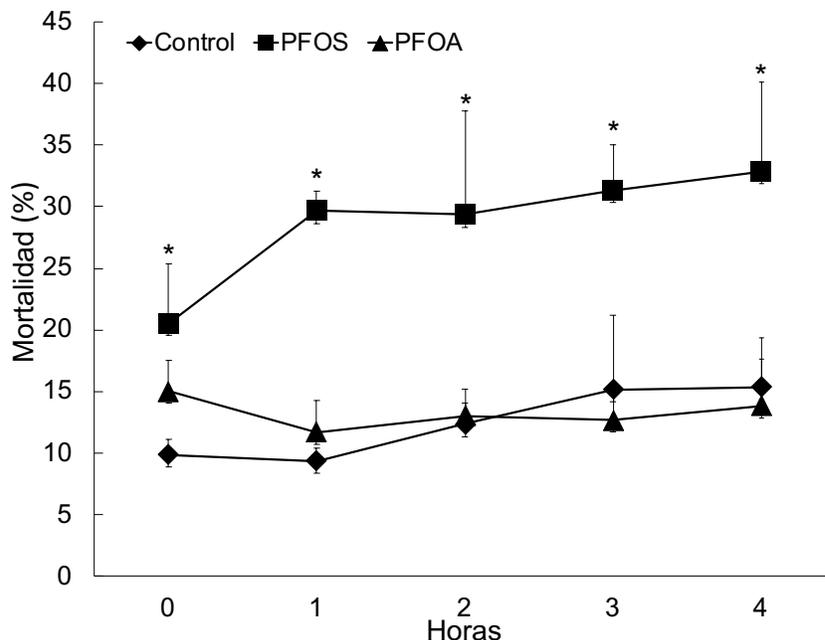


Figura 11. Efectos de concentraciones subletales de PFAS sobre la mortalidad espermática durante 4 horas en condiciones de capacitación. La capacitación espermática se realizó a 38 °C durante 4 h. Grupo control (sin PFAS), 274 μ M PFOS y 950 μ M PFOA. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo control incubado en ausencia de PFAS ($p < 0.01$), (media \pm DE, $n = 3$ experimentos independientes duplicados).

Efecto de PFAS sobre la capacitación y la RAi mediante la evaluación de la tinción con CTC

Mediante la evaluación de la capacitación con PFOS (274 μ M) y con PFOA (950 μ M) se encontraron los tres patrones característicos de CTC: no capacitado, capacitado y con RA (Figura 12A). Se observó una inhibición significativa de la capacitación de los espermatozoides con ambos compuestos. El patrón de CTC Cap fue significativamente más bajo con ambos PFAS que en el grupo control (64 % para el control, 36 % para PFOS, 46 % para PFOA) (Figura 12B). La RA basal de los espermatozoides NC fue, aproximadamente, de 14 %, mientras que para los

espermatozoides capacitados la RAI aumentó al 26 %. Mientras que en espermatozoides capacitados expuestos a PFOS no se indujo la RA, llegando solo al 2 %. Por otro lado, el PFOA no tuvo efecto en la RAI ya que los espermatozoides expuestos a PFOA alcanzaron también 26 % de espermatozoides con RAI (Figura 12C). En ambas evaluaciones de la capacitación y de la RA, las células muertas se descartaron mediante tinción con PI.

Efecto de PFAS sobre la RAI mediante la evaluación de tinción con FITC-PNA

Se utilizó FITC-PNA como técnica alternativa para corroborar los resultados del proceso de RAI en los espermatozoides tratados. PNA es una lectina que revela la presencia de acrosoma. Las células muertas se descartaron con tinción PI (Figura 13A). Al inducir la RA en todos los grupo se hizo una curva creciente de concentración-respuesta desde 0 μ M hasta 300 μ M de PFOS y desde 0 μ M hasta 950 μ M para PFOA (Figuras 13B y 13C). Se observó una disminución en la RAI de manera dependiente al incremento de la concentración con ambos tóxicos. Los espermatozoides NC presentaron aproximadamente 13-14 % de RAI, después de la capacitación la RAI fue de 25-27 %. Los espermatozoides capacitados expuestos a PFOS mostraron un valor de RAI bajo: 14, 11 y 1.5 % con 100, 200 y 300 μ M, respectivamente. Los espermatozoides capacitados expuestos a PFOA mostraron: 24, 23 y 18 % con 150, 550 y 950 μ M, respectivamente. Estos hallazgos indicaron que $\frac{1}{2}$ CL50 de PFOA disminuyó tanto la capacitación como el proceso de RAI. Sin embargo, observamos que el PFOS impidió significativamente la capacitación y la RAI en los espermatozoides de cerdo (Figura 13).

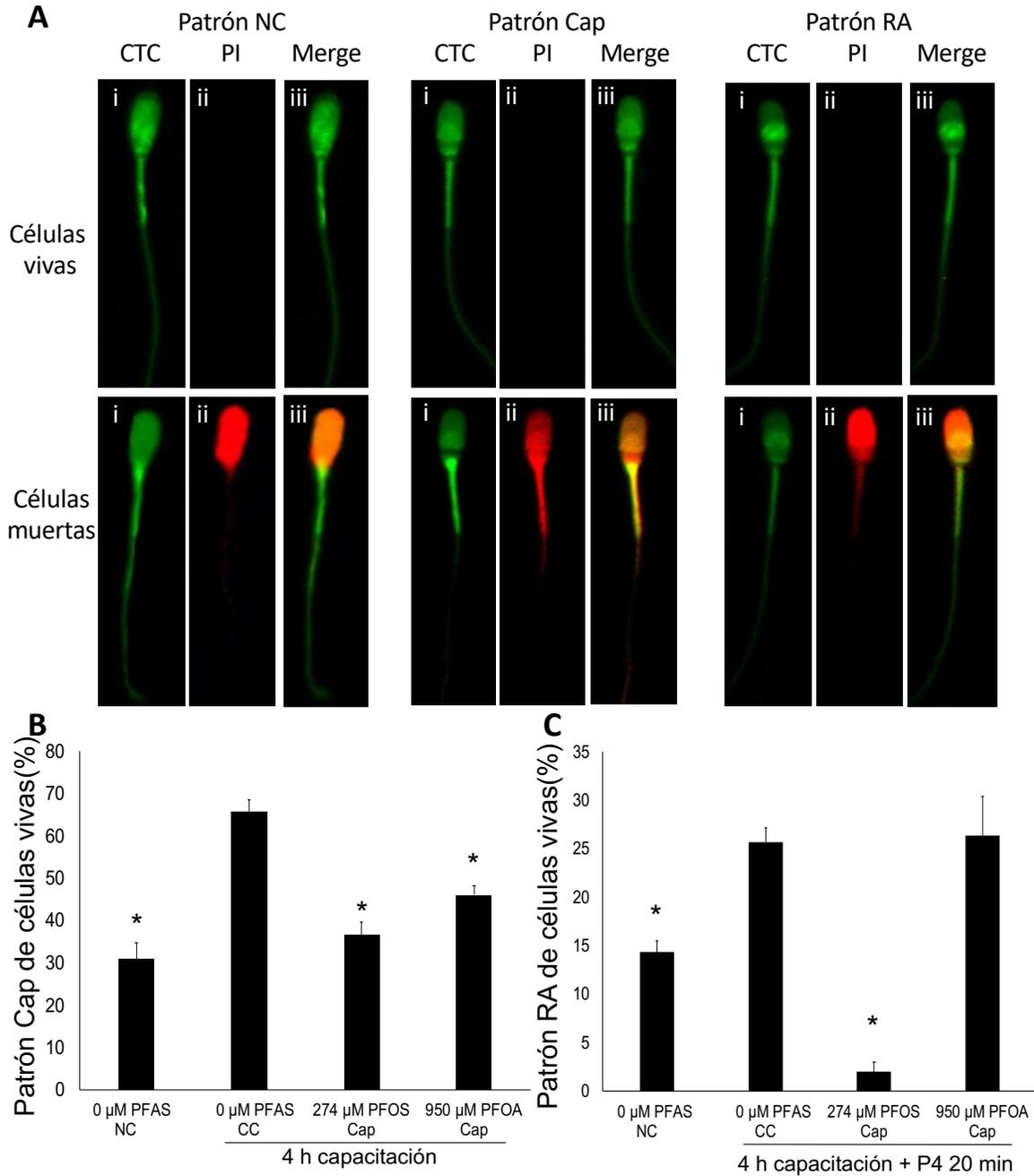


Figura 12. Efecto de PFOS y PFOA en la capacitación de espermatozoide de cerdo y la reacción acrosomal inducida (RAi) *in vitro* evaluada con CTC. La capacitación se realizó a 38 °C durante 4 h. La RA se indujo con 10 μg/mL de progesterona (P4) a 38 °C durante 20 min después de 4 h de capacitación. **A)** Patrones CTC/IP: NC: no capacitado; C: capacitado; RA: reacción acrosomal inducida (RAi). Se desecharon las células muertas. **B)** Proporción de patrón B. **C)** Proporción de patrón C. Los espermatozoides considerados capacitados fueron CTC positivos

con patrón B y RAi positivos con patrón C. *Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo 0 μM de PFAS CC ($p < 0.01$), (media \pm DE, $n = 3$ experimentos independientes y por duplicado).

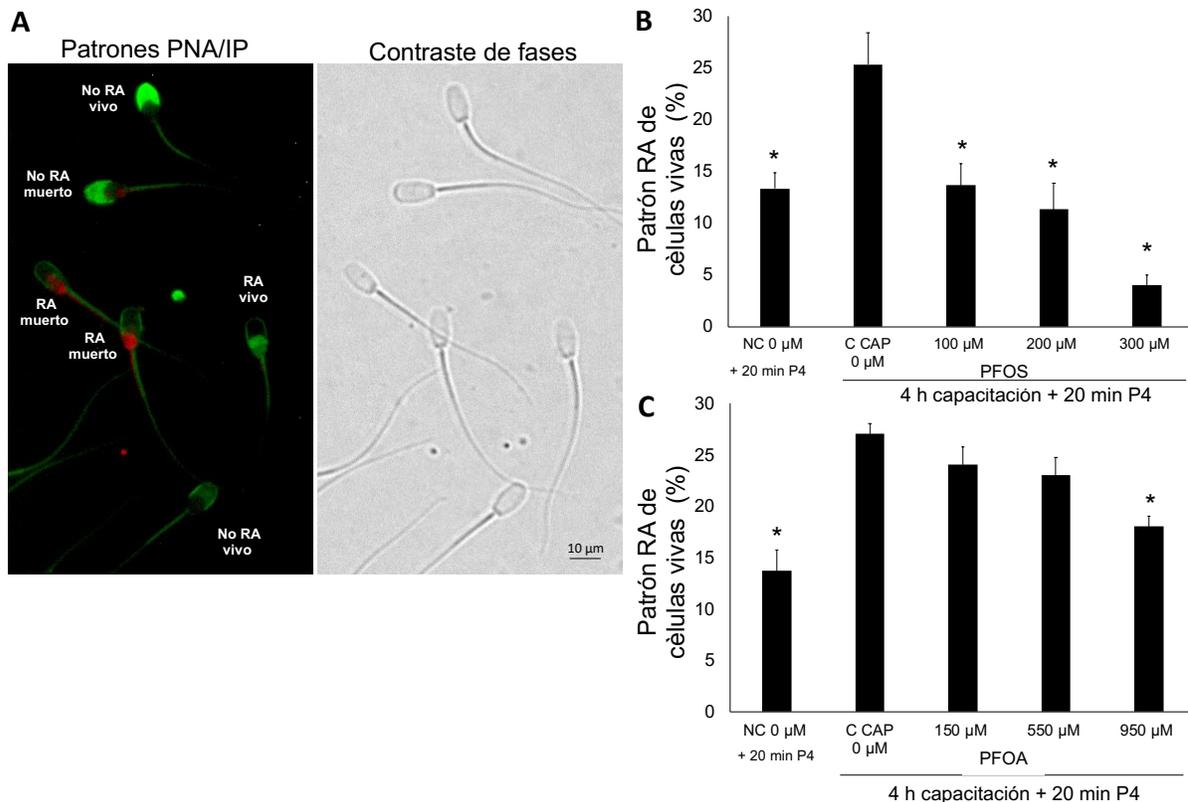


Figura 13. Efecto de PFOS y PFOA en la reacción acrosomal inducida (RAi) *in vitro* evaluada con PNA. A) Patrones FITC-PNA/IP: célula viva con RAi, célula muerta con RAi, célula viva sin RAi y célula muerta sin RAi. B) Proporción del patrón RA vivo de PFOS. C) Proporción del patrón RA vivo de PFOA. *Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo CCAP ($p < 0.01$), (media \pm DE, $n = 3$ experimentos independientes y por duplicado).

Se realizó una comparación de los valores resultantes mediante la técnica con CTC y PNA-FITC (Tabla 3). Se puede observar que la tendencia en los valores fue muy similar entre sí, sin embargo, la proporción de RA fue menor con PNA-FITC que con CTC a pesar de que no hubo diferencias significativas entre ambas técnicas. Excepto con

PFOA que, si presentó diferencias significativas de RA al comparar ambas técnicas. Se obtuvo una proporción de 26 % con CTC y 18 % con PNA-FITC de espermatozoides reaccionados concluyendo que la AR en los espermatozoides expuestos a PFOA fue menor con PNA-FITC.

Tabla 3. Comparación de técnicas de tinción con CTC y PNA-FITC para la identificación de la reacción acrosomal en espermatozoides de cerdo

Grupo	Reacción acrosomal (%)	
	CTC	PNA-FITC
Control	25.7 ± 1.52	24.6 ± 1.89
PFOS	2 ± 1	1.5 ± 1
PFOA	26.3 ± 4.04*	18 ± 1*

Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$), (media ± DE, experimentos independientes duplicados).

Efecto de PFOS y PFOA sobre el flujo de calcio intracelular

Para conocer si la inhibición del proceso de capacitación se debió a una desregulación de $[Ca^{2+}]_i$ se evaluó su entrada en una cinética de tiempo durante la capacitación. PFOS provocó un aumento inmediato y significativo de $[Ca^{2+}]_i$, comparado con los niveles bajos del grupo control a las 0 h. Estos niveles disminuyeron entre 1 y 2 h de capacitación, pero se produjo un aumento significativo a las 3 h, seguido de una disminución a las 4 h, aunque no regresó al nivel del grupo control. El $[Ca^{2+}]_i$ se mantuvo igual al control con PFOA hasta las 3 h de capacitación en la cual hubo un aumento significativo, seguido de una disminución a las 4 h que no fue significativamente diferente con el de las 3h. Estos resultados sugieren que ambos compuestos provocaron una acumulación de $[Ca^{2+}]_i$ a partir de las 3 h de capacitación (Figuras 14A y 14 B). La curva de fluctuación de $[Ca^{2+}]_i$ se midió en tiempo real después de 3 h de capacitación (Figuras 14C-E). El control tuvo una fluctuación basal durante

los primeros 500 segundos. Cuando se añadió el A23187, el valor de $[Ca^{2+}]_i$ aumentó y se mantuvo constante durante los siguientes 100 segundos (Figura 14C). Cuando estas mediciones se realizaron en presencia de PFAS, fue evidente un aumento en la fluctuación de $[Ca^{2+}]_i$ con ambas sustancias (Figuras 14D y 14E). Las muestras de espermatozoides incubadas en presencia de PFAS no respondieron al tratamiento con el ionóforo Ca^{2+} A23187. Además, los espermatozoides expuestos a PFOS y PFOA fueron estimulados durante la medición de $[Ca^{2+}]_i$ después de la capacitación con 10 μ g de P4 en el segundo 300 (Figuras 14F y 14H). En todas las medidas, se agregaron 10 μ M de ionóforo A23187 en el segundo 500 como control positivo. En este caso, cuando los espermatozoides capacitados fueron estimulados con P4, un aumento de $[Ca^{2+}]_i$, y el ionóforo A23187 respondió correctamente para aumentar y luego mantener los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 14F). Sin embargo, cuando los espermatozoides fueron expuestos a PFOS, la P4 disminuyó los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y el ionóforo no respondió (Figura 14G). Con PFOA, la P4 mantuvo los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ pero no respondió al ionóforo (Figura 14H).

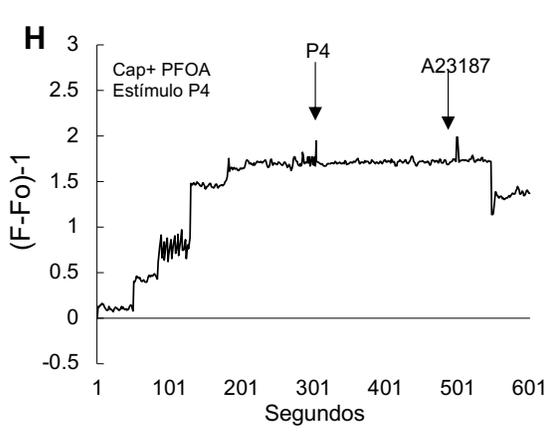
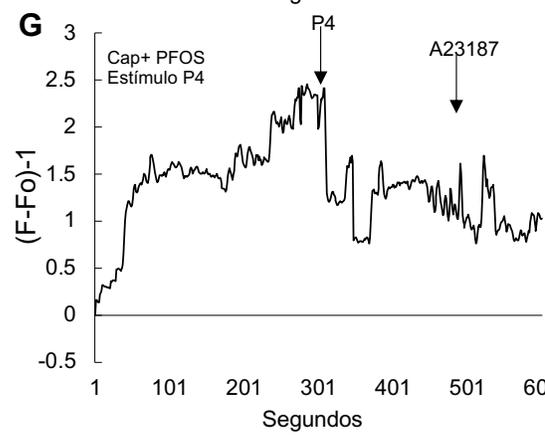
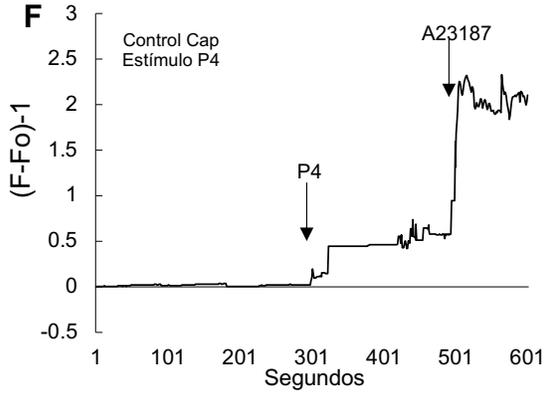
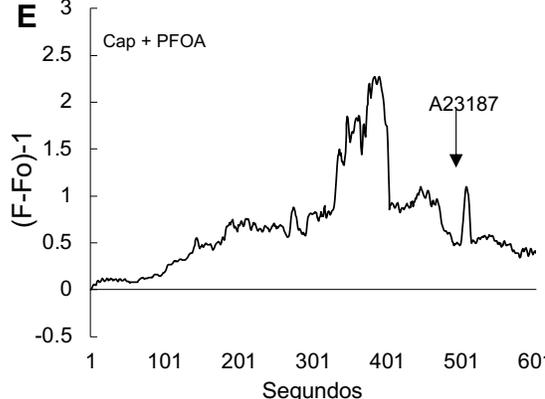
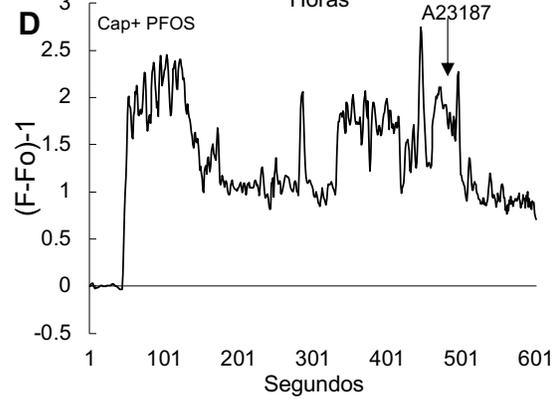
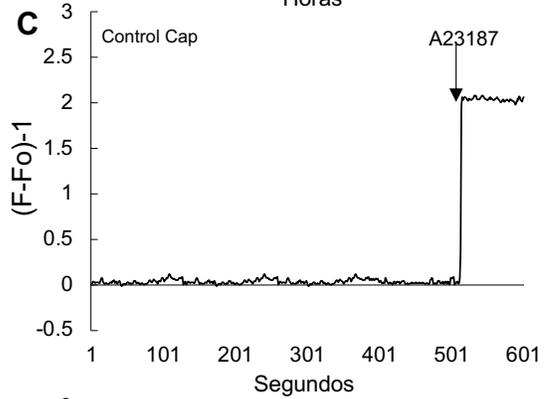
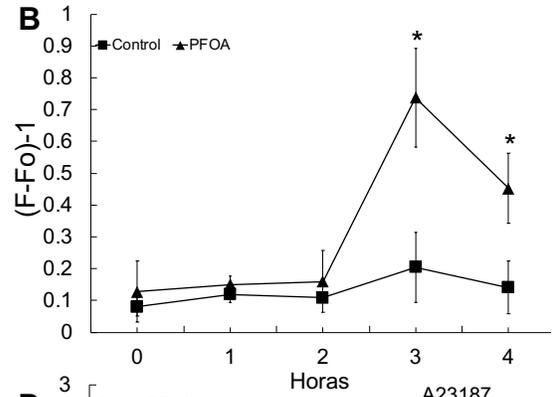
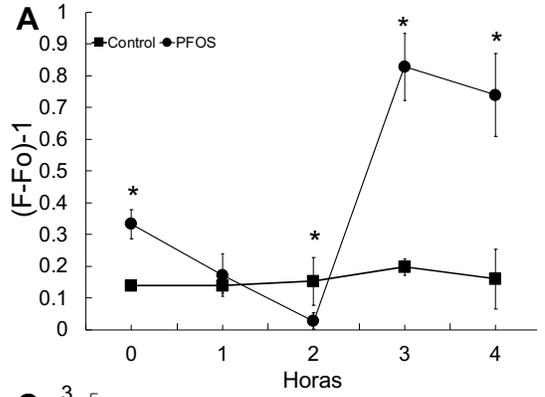


Figura 14. PFOS y PFOA indujeron un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de cerdo *in vitro*. (A y B) La capacitación de los espermatozoides se realizó a 38 °C durante 1-4 h bajo exposición a los tóxicos. **A)** Espermatozoides expuestos a PFOS; **B)** Espermatozoides expuestos a PFOA. Los cuadrados representan el grupo de control, 0 μ M de PFAS; los círculos representan PFOS; los triángulos representan PFOA. La exposición a PFOS produjo un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides NC desde el tiempo 0 h. El PFOA aumentó el $[Ca^{2+}]_i$ a partir de las 3 h. **(C-E)** A las 3 h, se midieron los niveles durante 600 segundos. Se añadió el ionóforo A23187 a los 500 segundos. **C)** Grupo de control, espermatozoides capacitados en ausencia de PFAS; **D)** Espermatozoides capacitados expuestos a PFOS; **E)** Espermatozoides capacitados expuestos a PFOA. **F)** Grupo de control, espermatozoides capacitados en ausencia de cualquier estímulo PFAS + de P4. **G)** Espermatozoides capacitados expuestos al estímulo PFOS + P4. **H)** Espermatozoides capacitados expuestos a PFOA + estímulo P4 * Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo de control ($p < 0.05$); normalizado $(F / F_0) - 1$; n= 3 experimentos independientes y por duplicado.

Efecto de PFOS y PFOA sobre el potencial de membrana en espermatozoides evaluado por fluorimetría

Después del tiempo de capacitación, E_{mv} disminuyó cuando se agregó la valinomicina por lo que indujo la hiperpolarización. Los aumentos graduales de KCl permitieron una repolarización gradual de la PM. La E_{mv} del control fue de -95 mV (Figura 3A). No fue posible calcular el valor de E_{mv} con los tratamientos con PFOS y PFOA debido a un aplanamiento de la curva de polarización de la membrana (Figuras 3B y 3C). La muestra tratada con PFOS mostró una pequeña respuesta a la valinomicina, pero el nivel anterior no se recuperó al agregar KCl para la repolarización. En el caso del PFOA, no hubo respuesta al estímulo de hiperpolarización con valinomicina, ni a la adición de KCl para inducir la repolarización. Curiosamente, estos resultados mostraron que los espermatozoides tratados con PFOS y PFOA no experimentan

cambios en el potencial de membrana. Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de que el daño significativo de PFAS está en el PM.

Efecto de PFOS y PFOA sobre la integridad membranal durante la capacitación

Los resultados anteriores sugieren que, tanto el PFOS como PFOA, pudieran estar alterando a la membrana del espermatozoide. Por lo tanto, para determinar el efecto de PFAS sobre la funcionalidad de MP, se utilizó la prueba HOS (hyposmotic) en espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de PFOS y PFOA la integridad membranal. Los resultados de funcionalidad de MP utilizando la prueba HOS se muestran en la figura 16.

En este trabajo, la funcionalidad se refiere a la integridad de la membrana y su capacidad para ser una barrera semipermeable. Usando la prueba de endosmosis, la funcionalidad de la membrana se mide con la capacidad de la membrana celular para regular su transporte en un ambiente hiposmótico.

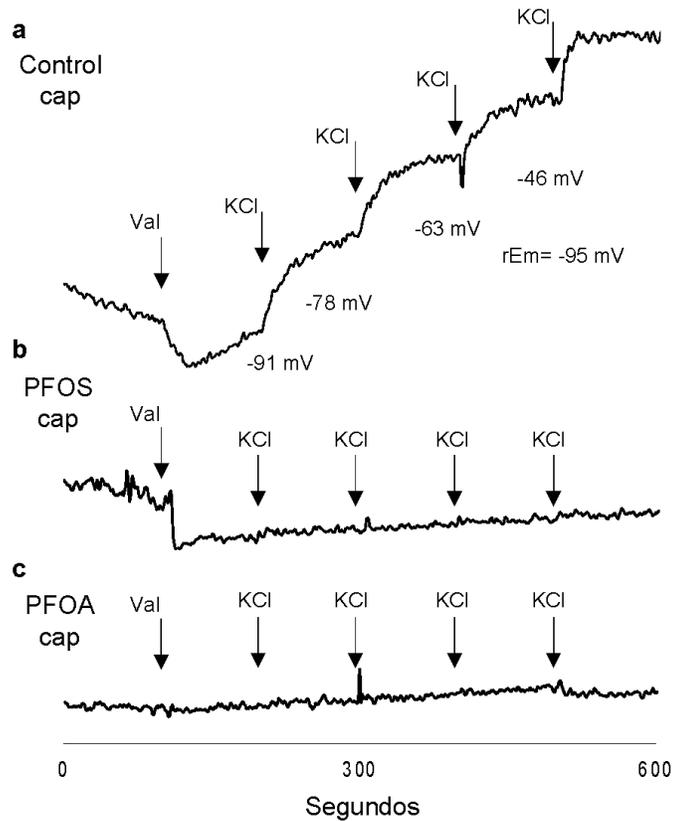


Figura 15. PFOS y el PFOA indujeron la desregulación del potencial de membrana (Emv) de los espermatozoides de cerdo *in vitro*. La capacitación espermática se realizó a 38 °C durante 4 h. La Emv se midió durante 600 segundos a 37 °C. A los 100 segundos, se añadió valinomicina para inducir la hiperpolarización de la membrana. A continuación, se añadieron concentraciones crecientes de KCl cada 100 segundos para inducir la despolarización de la membrana. En el grupo de control, la Emv se calculó mediante la ecuación de Nernst. **A)** Grupo de control sin productos químicos tóxicos; **B)** Espermatozoides capacitados expuestos a PFOS (274 μM); **C)** Espermatozoides capacitados expuestos a PFOA (950 μM). Ni el PFOS ni el PFOA permitieron la hiperpolarización inducida por valinomicina. Datos normalizados (F / F_0) -1; n= 3 muestras independientes y por duplicado.

Debido al desequilibrio entre el medio intracelular y extracelular, si hay integridad de la membrana, ésta tiende a aumentar su volumen porque permite el ingreso de agua a la célula. Si la membrana presenta alteraciones morfológicas como curvatura o hinchazón del flagelo (HOS+), se puede decir que la membrana celular es funcional y la membrana está íntegra. HOS se consideró negativo (HOS-) cuando los espermatozoides no tenían una MP intacta, lo que indica una pérdida de funcionalidad (ausencia de enrollamiento o hinchazón del flagelo) (Šichtař *et al.* 2019). Después de la capacitación, observamos 13-14 % de HOS- en el grupo control. Cuando los espermatozoides NC se expusieron a las PFAS por 10 minutos, la proporción de HOS aumentó inesperadamente al 45 % (3.3 veces) con PFOS y al 28 % (2 veces) con PFOA. Al final de la capacitación, esto aumentó al 49 % (3.6 veces) con PFOS y al 47 % (3.5 veces) con PFOA (Figura 16). Estos datos indican que tanto el PFOS como el PFOA afectaron la funcionalidad de la membrana durante la capacitación. Como hemos visto a lo largo de la investigación, el PFOS tiene un efecto más tóxico que el PFOA en el espermatozoide y es un efecto más rápido. Es por eso por lo que no existen diferencias significativas entre NC y capacitados con PFOS, pero sí con PFOA. Estos resultados indican que ambos PFAS modifican la integridad de la membrana del espermatozoide, generando un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ durante la capacitación, pudiendo ser esto una de las causas de su citotoxicidad.

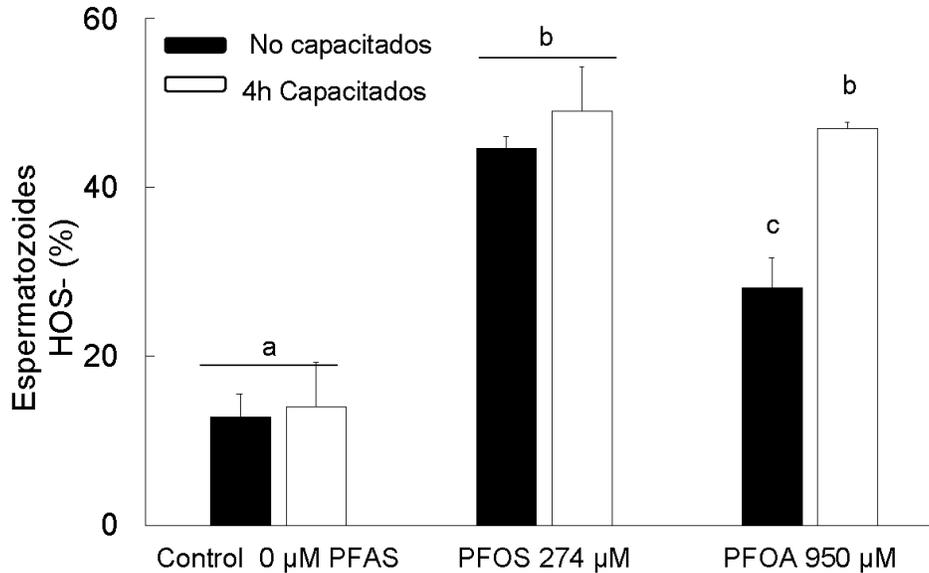


Figura 16. El PFOS y el PFOA indujeron la disfunción de la MP de los espermatozoides de cerdo. La proporción de la prueba HOS⁻ se evaluó en espermatozoides capacitados y no capacitados, un grupo de control y muestras expuestas a PFOS (274 μM) y PFOA (950 μM). Ambos compuestos tóxicos aumentaron los resultados de la prueba HOS⁻ para la membrana disfuncional y no intacta. a-c Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); n= 3 muestras independientes y por duplicado.

El PFOS y el PFOA bloquean la salida de colesterol de la membrana

Es importante saber si el daño en el espermatozoide de cerdo causado por la exposición a PFOS y PFOA genera una alteración en los niveles de colesterol en la membrana, recordemos que durante la capacitación es indispensable un eflujo del colesterol para que se lleven a cabo los cambios necesarios en la membrana. Se determinó el colesterol en espermatozoides capacitados en presencia de PFAS y se evaluó mediante tinción de filipina que mostró dos patrones fluorescentes característicos de NC y espermatozoides capacitados. Se observó una fluorescencia menos intensa en los espermatozoides capacitados que en los espermatozoides NC

(Figura 17a); esto es consecuencia de la salida de colesterol. La cuantificación de la fluorescencia muestra una reducción significativa en los espermatozoides capacitados con respecto a los espermatozoides NC (Figura 17b). Cuando los espermatozoides se expusieron a PFOS y PFOA, el nivel de fluorescencia de filipina fue similar al de los espermatozoides NC. Estos resultados sugieren que la salida de colesterol de la membrana se detuvo debido al daño en la MP producido por la toxicidad de las dos PFAS.

Efecto de PFOS y PFOA sobre la distribución de L-fucosa sobre la capacitación y RA

Como paso siguiente se investigó si el daño en el espermatozoide de cerdo causado por la exposición a PFOS y PFOA genera una alteración en la redistribución de los carbohidratos de membrana. Para ello se analizó su efecto en los residuos de L-fucosa en la membrana del espermatozoide, ya que este carbohidrato tiene un papel importante durante la reproducción, funcionando como una señal importante de reconocimiento entre el espermatozoide y el ovocito. La distribución de L-fucosa se evaluó mediante microscopía de fluorescencia con la lectina UEA conjugada a FITC (Figura 18).

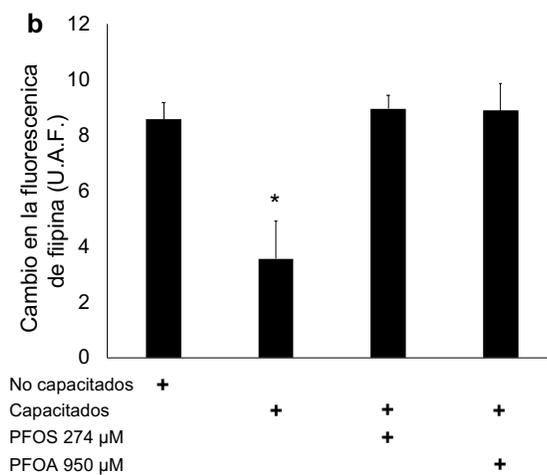
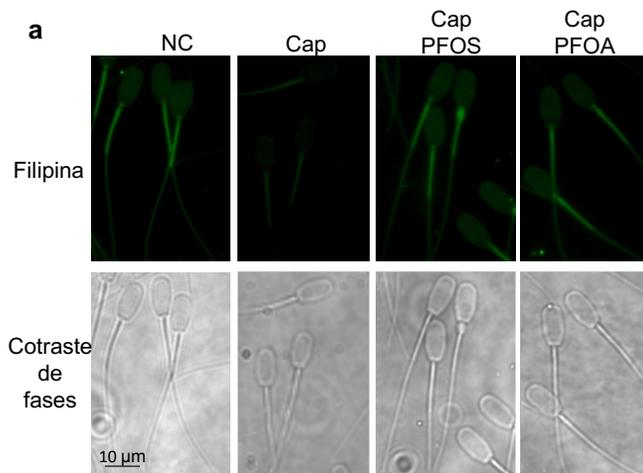


Figura 17. PFOS y PFOA bloquearon la salida de colesterol de la membrana plasmática en espermatozoides de cerdo. a) Patrones de fluorescencia de filipina (marcador del colesterol) en espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (Cap), capacitados más PFOS y capacitados más PFOA. **b)** Unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.F.). El grupo Cap disminuyó la fluorescencia con respecto al grupo NC, los grupos con PFOS y PFOA no presentaron disminución con respecto al NC. *El asterisco indica diferencias estadísticas significativas con respecto a los demás grupos ($p < 0.05$); (media \pm DE; n= 3 experimentos independientes y por duplicado).

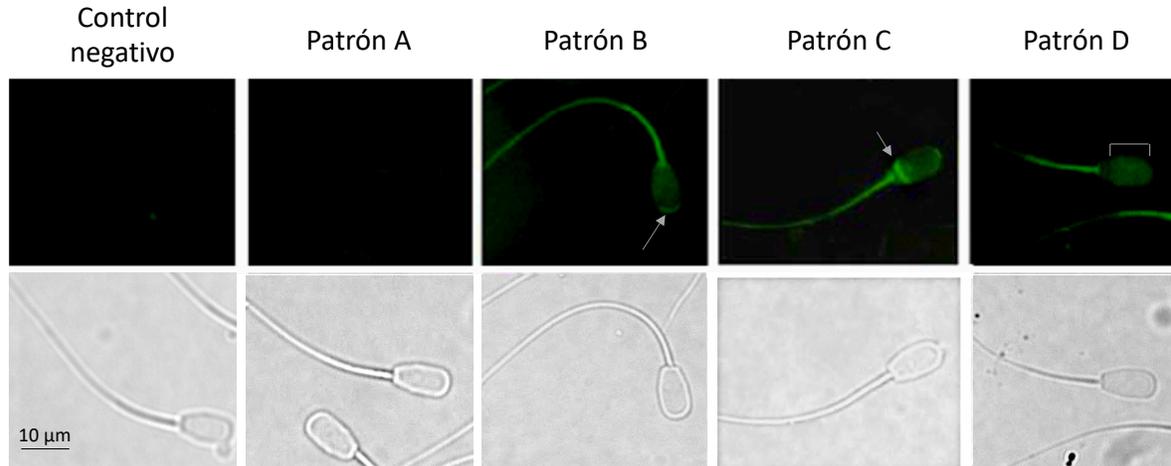


Figura 18. Patrones de fluorescencia con UEA-FITC ante la exposición de PFOS y PFOA.

Patrones A-C. **A)** Sin fluorescencia, **B)** fluorescencia concentrada en la zona apical y en la pieza media del flagelo, **C)** fluorescencia concentrada en la región ecuatorial y en el flagelo, **D)** fluorescencia sobre la región acrosomal y en el flagelo. Control negativo: L-fucosa libre+ lectina UEA. n= 3 experimentos independientes y por duplicado.

Se presentaron cuatro patrones principales de tinción de la lectina UEA-FITC cuando los espermatozoides fueron expuestos a PFOS y a PFOA. El patrón A se caracterizó por la ausencia de fluorescencia, en el patrón B la fluorescencia se concentró principalmente en la zona apical y en la pieza media del flagelo. El patrón C se distinguió por que la fluorescencia permaneció en la región ecuatorial y el flagelo, mientras que el patrón D reveló fluorescencia principalmente en la región acrosomal y el flagelo.

Como control negativo se realizó en paralelo la incubación del azúcar L-fucosa libre junto con la lectina UEA durante 30 min antes de ser adicionada a los espermatozoides lo cual permitió verificar la especificidad de la lectina (Figura 18).

Una vez que se identificaron los patrones de fluorescencia se determinó la proporción de espermatozoides que presentan cada uno de los patrones. Al comparar el grupo

control no capacitado (NC) con el grupo control capacitado (C CAP) se pudo observar que el patrón A sin fluorescencia aumenta y disminuye el patrón B cuando los espermatozoides se encuentran en condiciones capacitantes. En los espermatozoides capacitados en presencia de PFOS disminuyó un 55 % el patrón A, aumentó un 22 % el patrón B y aumentó 37 % el patrón C con respecto al grupo control C CAP. Cuando los espermatozoides capacitados fueron expuestos a PFOA disminuyó un 50 % el patrón A con respecto al C CAP, aumentó un 22 % el patrón B y apareció el patrón D con un 24 % con respecto al grupo control C CAP (Figura 19).

Al inducir la RA posterior a la capacitación y exposición a los PFAS, únicamente estuvieron presentes dos patrones de fluorescencia con la lectina UEA-FITC, el patrón A y el patrón B. En el grupo control RA (C RA), el patrón A se presentó en un 60 % mientras que el patrón B en 40 %. En los grupos con presencia de PFOS y PFOA el patrón A no tuvo cambios significativos con respecto al grupo control C RA, sin embargo, el patrón B disminuyó 16 % para PFOS y 23 % para PFOA.

Estos resultados indican que PFOS y PFOA modifican la distribución de los residuos de L-fucosa en los procesos de capacitación y RA en los espermatozoides de cerdo *in vitro* (Figura 20).

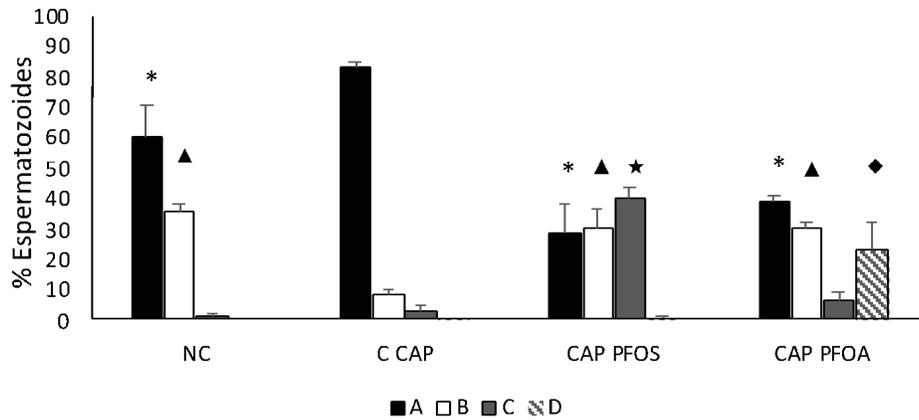


Figura 19. Efecto de PFOS y PFOA sobre la redistribución de L-fucosa durante condiciones capacitantes en espermatozoide de cerdo. Después de la capacitación espermática (C CAP), el patrón A incrementa, principalmente a expensas del patrón B, mientras que los patrones C y D se mantienen en muy baja proporción. En presencia de PFOS y PFOA, el patrón A decrece con respecto a los dos grupos control, no capacitados y capacitados, incrementando los patrones C para PFOS y D para PFOA. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$. (*, ▲, ★, ◆) = Diferencias significativas con respecto al grupo control positivo (C CAP).

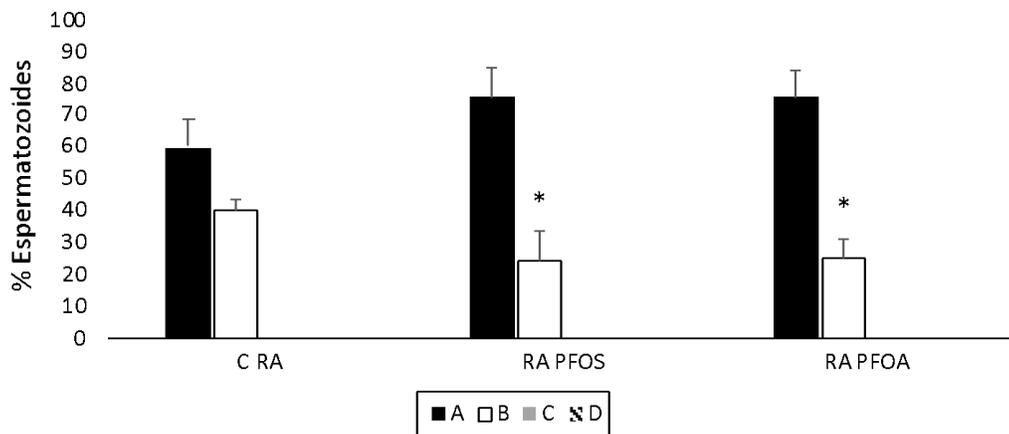


Figura 20. Efecto de PFOS y PFOA sobre la distribución de L-fucosa en el espermatozoide de cerdo durante condiciones de inducción de RA. El patrón B decreció cuando los espermatozoides fueron expuestos a PFOS y PFOA.

Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$. (*) = Diferencias significativas con respecto al grupo control RA (C RA).

Los PFAS impiden el movimiento y la distribución normales de los MDM.

Los espermatozoides de cerdo presentaron MDM que cambiaron su distribución espacial en la membrana de la zona apical de la cabeza durante la capacitación (van Gestel *et al.* 2005). Flotilina 1 y 2 se han utilizado como marcadores de MDM. Debido a que los MDM se redistribuyen durante la capacitación, examinamos el efecto del PFAS en los MDM. Los espermatozoides fueron capacitados en presencia de PFOS y PFOA, y se reveló flotilina-1 usando un anticuerpo anti-flotilina-1; se observaron tres patrones de fluorescencia característicos (Figura 21A): el patrón 1 presentó fluorescencia en la región acrosomal y el flagelo; el patrón 2 mostró fluorescencia agrupada en la zona apical (marcada por flechas) y la pieza central; el patrón 3 reveló la presencia de fluorescencia solo en la pieza intermedia. Se cuantificaron las proporciones de espermatozoides que presentaban estos tres patrones (Figura 21B). Para los espermatozoides NC, el patrón 1 fue predominante (~93 %), mientras que en los espermatozoides capacitados, los patrones 1 y 2 mostraron proporciones similares (~51 % y ~49 %, respectivamente). Cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia de PFOS o PFOA, predominó el patrón 1 (~85 % y ~70 %, respectivamente) sobre los demás. El patrón 3 se detectó solo en los espermatozoides tratados con PFOA y PFOS (~2.5 % y ~5 %, respectivamente). Este hallazgo indica que, bajo la exposición a estos compuestos, los MDM no se reorganizaron de la forma en que lo hacen normalmente durante la capacitación.

Es bien sabido que la movilidad de las proteínas de las balsas lipídicas, como la flotilina y las caveolinas, depende de la activación de la calpaína (Maldonado-García *et al.*

2017). Por lo tanto, como control negativo, determinamos si la calpeptina, un inhibidor específico de la calpaína, también inhibía la migración de la flotilina.

Los resultados mostraron que la inhibición de la calpaína no permite cambios en la localización de la flotilina. Como control positivo se corroboró la presencia de flotilina en células de cobayo, donde su ubicación está bien estandarizada, principalmente en la zona apical de la cabeza (Maldonado-García *et al.* 2017).

El anticuerpo antiflotilina primario solo, en ausencia del anticuerpo secundario y del inhibidor de calpaína (calpeptina), se usó como control negativo. Flotilina-1 dispersada en el acrosoma en los espermatozoides no capacitados, y flotilina-1 detectada en la zona apical de la cabeza en los espermatozoides capacitados del cobayo se usaron como controles positivos (Figura 22).

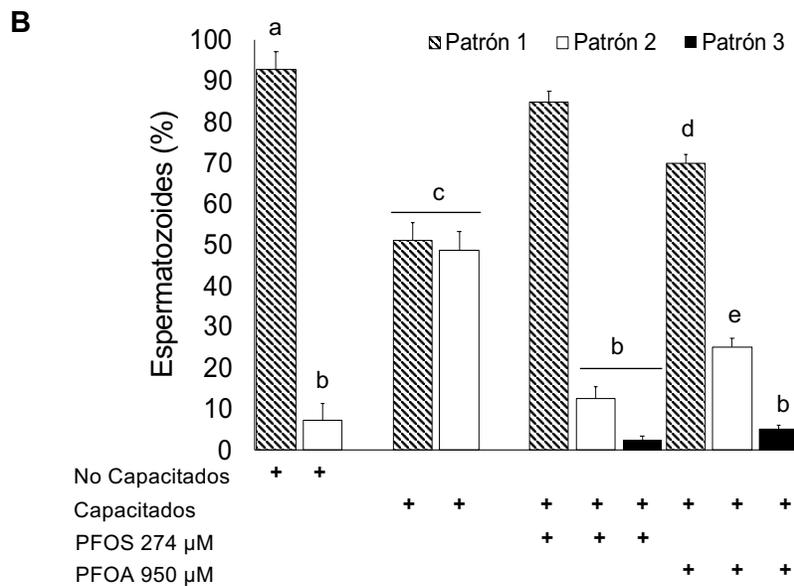
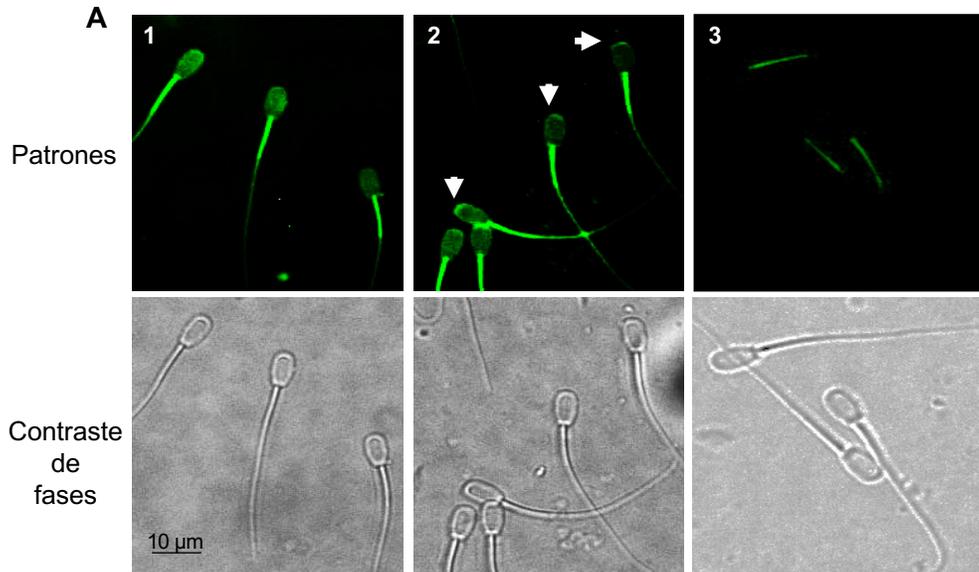


Figura 21. PFOS y PFOA alteraron el reordenamiento de la distribución espacial de los microdominios de la membrana del espermatozoide de cerdo. Los espermatozoides fueron capacitados durante 4 h. Los microdominios se evaluaron mediante localización con flotilina-1. **A)** Patrones de fluorescencia de flotilina-1. **B)** Cuantificación de los tres patrones en espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de PFOS (274 µM) y PFOA (950 µM). a, b, c, d Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); (media \pm DE; $n = 3$ experimentos independientes por duplicado).

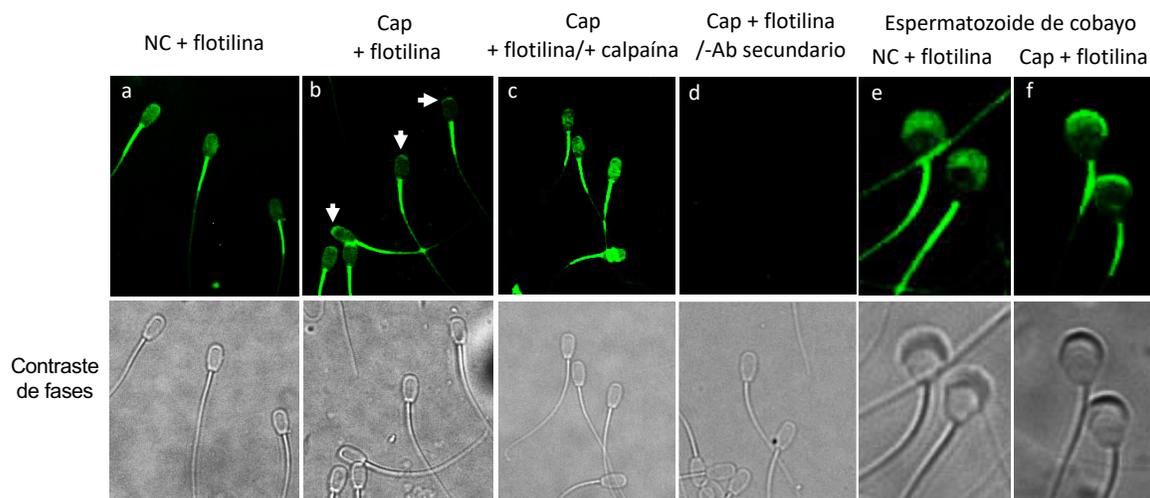


Figura 22. Controles de flotilina-1 inmunomarcada. **a)** No capacitado + flotilina-1, fluorescencia distribuida en el acrosoma de la cabeza. **b)** Capacitado +. Flotilina-1, fluorescencia agrupada en la zona apical de la cabeza (flechas). **c)** Control negativo: capacitado + flotilina-1 + inhibidor de calpeptina (calpaína); la inhibición evita el reordenamiento de la flotilina en la zona apical de la cabeza. **d)** Control negativo: capacitado + flotilina-1 sin Ab secundario; ausencia de fluorescencia. **e)** Control positivo: Espermatozoides de cobayo no capacitados + flotilina-1; fluorescencia dispersa en el acrosoma. **f)** Control positivo: Espermatozoides de cobayo capacitados + flotilina-1; fluorescencia agrupada en la zona apical de la cabeza.

Efecto de PFOS y PFOA sobre de la remodelación del citoesqueleto de actina

Para analizar la polimerización del citoesqueleto de actina, los espermatozoides capacitados se tiñeron con el colorante faloidina-FITC. Se encontraron dos principales patrones de fluorescencia en espermatozoides de cerdo, el patrón 1 se distingue por tener fluorescencia únicamente en la pieza media, mientras que el patrón 2 se distingue por que la fluorescencia se distribuye en todo el espermatozoide (Figura 23).

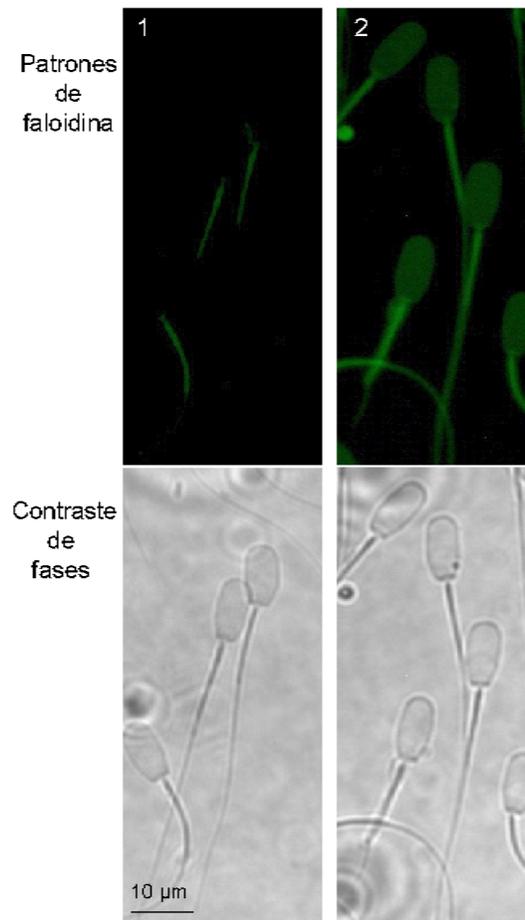


Figura 23. Patrones de fluorescencia de faloidina en los espermatozoides. Se evaluó la polimerización de la F-actina con colorante faloidina. Los grupos de control capacitados y no capacitados y los espermatozoides capacitados se expusieron a PFOS (274 μM) y PFOA (950 μM). a, b, c Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); (media \pm s.e.m.; $n = 3$ experimentos independientes y por duplicado).

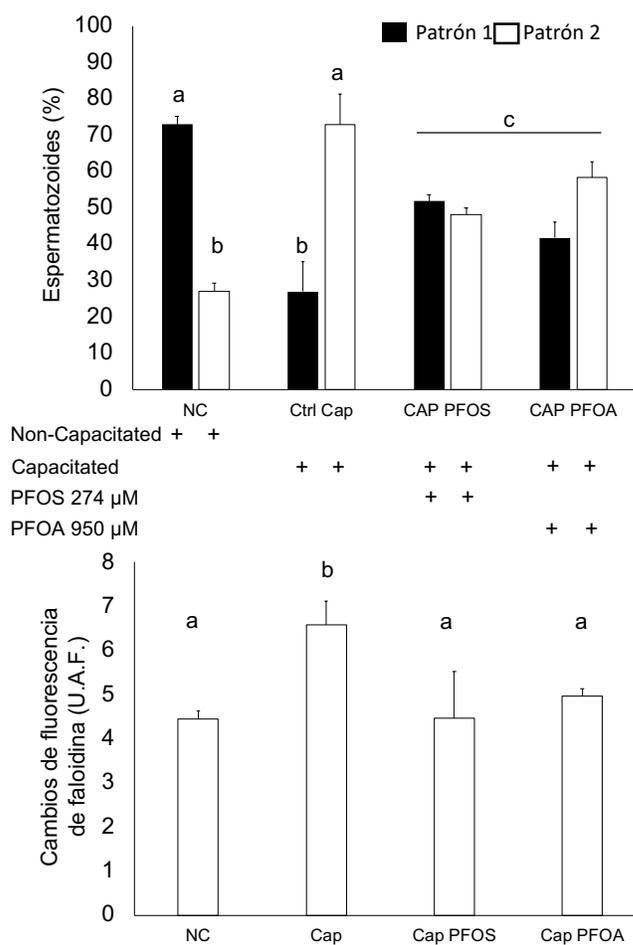
La presencia de ambos patrones nos indica el grado de polimerización de actina y la heterogeneidad de capacitación en la muestra espermática. Probablemente el patrón 1 el cual únicamente presenta fluorescencia de actina-F en la pieza media puede ser

que aún no tenga polimerización de capacitación avanzada como el patrón B donde hay fluorescencia homogéneamente en todo el espermatozoide.

Se cuantificaron los espermatozoides expuestos a PFOS y PFOA que presentan los patrones 1 y 2 de fluorescencia de actina (Figura 24). El patrón 1 predominó en los espermatozoides no capacitados, pero el patrón 2 predominó en los espermatozoides capacitados.

La F-actina se distribuyó espacialmente a lo largo de los espermatozoides (patrón 2) en el 73 % de los espermatozoides capacitados, por lo que se tomó como patrón característico de esta población. En tratamiento con PFOS y PFOA, la F-actina disminuyó a 48 y 58 % en las muestras expuestas a PFOS y PFOA, respectivamente.

Ambos tóxicos evitaron la remodelación de la F-actina cuando estaba presente durante



la capacitación espermática (Figura 24).

Figura 24. El PFOS alteró la distribución espacial de la f-actina. Espermatozoides capacitados por 4 h. Se evaluó la polimerización de la f-actina con colorante faloidina. Ambos PFAS mostraron disminución del patrón 2 en comparación con el grupo control capacitado. C) PFOS y PFOA impidieron la polimerización de membrana de actina-F en la cabeza y la pieza intermedia (patrón 2) en comparación con el control capacitado. a, b, c Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); media \pm DE; n= 3 experimentos independientes y por duplicado.

Discusión

En este estudio se analizaron los efectos tóxicos agudos de PFAS para dilucidar el posible mecanismo de daño en los procesos fisiológicos de capacitación y RA en espermatozoides de cerdo. Las concentraciones utilizadas se basaron en un análisis toxicológico que permitió determinar las CL50, posteriormente, se utilizaron en nuestros ensayos las concentraciones subletales $\frac{1}{2}$ CL50 para PFOS (que coincide en similitud con la CIC50) y $\frac{1}{2}$ CL50 para PFOA. Estas concentraciones subletales fueron del orden de μM : 274 μM para PFOS y 950 μM para PFOA. Otros estudios en los que se determinaron concentraciones μM de PFAS involucraron líneas celulares de hepatocarcinoma, donde la CI50 (concentración de inhibición de la viabilidad celular media) fue de 235.74 μM para PFOA (Abudayyak, Öztaş y Özhan 2021), y de *C. elegans*, donde la CL50 de PFOS fue de 2030 μM (Chen *et al.* 2014). Estas evidencias apoyan el uso de concentraciones de μM en el presente trabajo. Una variable más de la toxicología para determinar la toxicidad de un compuesto es el tiempo de exposición, el tiempo de los espermatozoides que se exponen a los compuestos tóxicos en el tracto reproductivo de la hembra es variable y puede ser prolongado (Suarez y Pacey 2006) aunque las concentraciones en el tracto femenino pueden ser bajas en el orden de los nm, se tiene que tomar en cuenta el largo tiempo de exposición al momento de evaluar la toxicidad de un compuesto. Los espermatozoides también estarían expuestos a los compuestos tóxicos durante un tiempo prolongado en el aparato reproductor masculino, debido que las PFAS pueden cruzar la barrera hematotesticular (Wan *et al.* 2014), tienen al menos cinco semanas de diferenciación testicular y dos semanas de maduración en el epidídimo (França, Avelar y Almeida 2005). Por lo tanto, la

exposición a las PFAS puede ocurrir desde el testículo hasta la fertilización del ovocito. Debido a la dificultad de realizar estudios toxicológicos *in vivo* en el aparato reproductor femenino y masculino, los estudios agudos *in vitro* constituyen el medio ideal para evaluar el posible efecto de las sustancias tóxicas sobre los espermatozoides durante su recorrido por el oviducto y testículo-epidídimo-glándulas accesorias. Los estudios *in vitro* se utilizan como modelos porque permiten manejar de manera controlada las variables involucradas, y permiten determinar su efecto puntual y dilucidar el posible mecanismo de daño en procesos fisiológicos como la capacitación y la RA [7]. Es por esto, que en este estudio el tiempo de exposición fue de 4 h correspondiente al tiempo que dura la capacitación espermática, con 20 min adicionales que corresponden al tiempo necesario para inducir la RA con P4. Esto se realizó con el fin de determinar el nivel de toxicidad de las PFAS en ambos procesos.

En nuestro grupo de trabajo se determinó con anterioridad que PFOS disminuye la movilidad espermática, la capacitación y la RA (Oseguera-López *et al.* 2020). Posteriormente en este trabajo observamos que PFOA no afectó la movilidad pero también disminuyó la proporción de células capacitadas aunque en menor proporción que con PFOS. La RA de espermatozoides expuestos a PFOA parecía permanecer sin cambios cuando se evaluó con CTC, sin embargo, cuando se evaluó mediante la técnica de tinción FITC-PNA, la proporción de espermatozoides con RA fue menor que con la técnica de CTC. El mismo efecto ocurrió con PFOS indicando que la técnica de tinción con PNA conjugada con FITC es más precisa para evaluar la RA. Fue evidente que PFOS tiene un efecto negativo mayor en la capacitación y la RA que PFOA, sin embargo, ambos compuestos afectaron dichos procesos de manera significativa.

Es bien sabido que la capacitación está ampliamente ligada con la entrada de Ca^{2+} , que dispara la vía de señalización PKA para la activación de proteínas responsables de la movilidad espermática como las dineínas del axonema flagelar. En este estudio se encontró que PFOS y PFOA desregularon los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, generando un desequilibrio en su homeostasis que es necesario para llevar a cabo la capacitación y la RA de manera correcta. También se observó que se inhibe la entrada de Ca^{2+} ante la adición del ionóforo A23187, esta inhibición contribuye a su desregulación dentro de la célula; un exceso de este ion divalente en las células puede interferir con funciones esenciales durante el proceso de capacitación. Se ha observado que, tanto PFOS como PFOA, se acumulan en las neuronas y elevan las concentraciones de Ca^{2+} por la liberación desde compartimientos de Ca^{2+} (Liu, X *et al.* 2011). Así mismo, se ha visto que PFOS aumenta los niveles de Ca^{2+} en neuronas corticales de rata (Oh, J *et al.* 2018) y que la expresión de los canales de Ca^{2+} tipo L decrece, interrumpiendo el flujo correcto de Ca^{2+} en cardiomiocitos después de un tratamiento con PFOS (Tang, L *et al.* 2017).

La ketamina es un anestésico utilizado en la medicina humana y animal, se ha demostrado que causa efectos tóxicos al espermatozoide de humano. Algunos de estos efectos son la disminución de la movilidad progresiva y la inhibición de la RA relacionada con disminución del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La ketamina también inhibió a CatSper, un canal específico de espermatozoide que modula el flujo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (He *et al.*, 2016). Se ha reportado que en miocitos ventriculares y en células de Purkinje (Harada *et al.*, 2006) expuestos a PFOS, la duración y el pico del potencial de acción de los canales de Ca^{2+} tipo L disminuyeron significativamente cambiando el potencial de membrana y, como consecuencia, se alteró la cinética del Ca^{2+} por la presencia de PFOS. Los

canales de Ca^{2+} tipo L también se encuentran en el espermatozoide y, al ser bloqueados con Verapamil, la hipermovilidad se anuló, demostrando que son fundamentales para la movilidad del espermatozoide (Takahashi *et al.*, 2013). PFOS y PFOA podrían generar el daño a nivel de membrana provocando que los canales de Ca^{2+} no funcionen de manera correcta en el influjo de Ca^{2+} y a su vez que se aumenten las concentraciones de Ca^{2+} por su liberación desde compartimientos internos como la mitocondria o membranas redundantes. El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocado por PFOS podría generar daño en la capacitación inhibiéndolo, y como consecuencia, la RA también se inhibe. El incremento de Ca^{2+} provocado por PFOA puede activar la capacitación y una RA temprana. Posiblemente el daño de PFOS y PFOA hacia los espermatozoides sea a nivel de los canales o bombas de Ca^{2+} como los tipo L, CatSper, CERCA o PMAC4 (bomba de Ca^{2+} ATP asa); estos, a su vez, son regulados por cambios en el pH y en el potencial de membrana. Es bien sabido que la hiperpolarización de la MP está relacionada con la activación de los canales de Ca^{2+} necesarios para la captación de Ca^{2+} durante la capacitación y la RA. Por esta razón, cuando vimos el incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, decidimos evaluar el cambio en el potencial de membrana durante la capacitación de los espermatozoides de mamíferos cuando los espermatozoides estaban expuestos a las PFAS.

PFOS y PFOA afectaron la conductancia de la membrana lipídica mediada por valinomicina encargada de transportar los iones K^+ e inducir la hiperpolarización de la célula, este efecto no se produjo. Por tanto, no fue posible medir la Emv en presencia de los compuestos estudiados, lo que sugiere la posibilidad de disfunción del transporte a nivel de membrana. Es probable que los compuestos perfluorados afecten la capacitación y RA al alterar el potencial de membrana permitiendo la activación o

inhibición de canales responsables del influjo de Ca^{2+} . Debido a que los resultados indican una disfuncionalidad en la membrana se realizó la prueba HOS y observamos que desde el inicio de la exposición hubo un incremento de 3.3 veces y 2 veces más para PFOS Y PFOA respectivamente. Al final de la capacitación el daño fue de 3.6 veces y 3.5 veces más, indicando que el daño comienza una vez que las PFAS entran en contacto con la membrana plasmática del espermatozoide. Como hemos visto a lo largo de la investigación, PFOS tiene un efecto más tóxico que PFOA en los espermatozoides y es un efecto más rápido, es por ello por lo que no hubo diferencias de daño entre NC y capacitados con PFOS, pero con PFOA sí hubo diferencia creciente. Se ha visto que PFOA se retiene en la membrana causando daño a las células HeLa (Peropadre *et al.* 2020) y en espermatozoides de humano se ha presentado alteración en la movilidad debido a la ruptura membranal (Šabović *et al.* 2019). Al igual que lo observado en este trabajo, se ha visto que hubo alteración de la membrana en *Escherichia coli* expuestos a PFOS y PFOA en presencia de daño del ADN debido a daño oxidante (Liu *et al.* 2016). De igual manera, en nuestro grupo de trabajo se encontró presencia de daño al ADN en espermatozoides de cerdo expuestos a PFOS y PFHxS en relación a un incremento de EROS (Oseguera-López *et al.* 2020). Es posible que las PFAS al integrarse a la MP generen un daño desequilibrando las EROS. Como ya hemos mencionado con anterioridad, las EROS se producen de manera fisiológica durante la capacitación, un desequilibrio en su producción podrían afectar el proceso de capacitación.

Debido al daño observado en la membrana plasmática fue de suma relevancia conocer cuáles son los cambios que surgen en la membrana que son necesarios para el logro de la capacitación y RA. Uno de los eventos mediados por las EROS es el correcto

eflujo del colesterol de la MP. Tanto PFOS como PFOA evitaron la salida del colesterol en los espermatozoides capacitados. Se ha demostrado que una producción equilibrada y fisiológica de las EROS oxidan al colesterol para la formación de oxiesteroles asociándose con la activación de proteínas transportadoras de esteroides como las HDL y la albúmina (Boerke *et al.* 2008; Boerke *et al.* 2013). La producción no fisiológica de las EROS por parte de PFOS puede estar involucrada en interrumpir la activación de las proteínas captadoras de esteroides dañadas. Es posible que el efecto que observamos de la ausencia de eflujo del colesterol durante la capacitación con PFOS y PFOA se deba a un desequilibrio de las EROS necesarias para la captación del colesterol. En estudios *in silico* de membranas POPC (palmitoil- 2- oleoil- glicerol- 3-fosfolina) computarizadas, se ha determinado que las moléculas de PFAS se incrustan en la membrana y tienen un efecto de condensación similar al colesterol; este efecto no permite buen dinamismo de moléculas a través de la membrana cuando las PFAS están incrustadas. Además la presencia de las PFAS en la membrana generan un incremento en el grosor de la bicapa membranal, este aumento es mayor con PFOS que con PFOA. También se observó que las PFAS interactúan con el grupo fosfato de los fosfolípidos de la membrana mediante enlaces de hidrógeno y el área por fosfolípido es disminuído tras esta interacción (Shen *et al.* 2020). Estos fenómenos estudiados *in silico* dan una idea de cómo podrían comportarse las PFAS de manera experimental y explicaría el por qué en el espermatozoide los tóxicos PFOS y PFOA no permiten la salida del colesterol de la membrana, al no haber dinamismo, es posible que no haya captación del colesterol por parte de las proteínas captadoras de esteroides como la albúmina y las HDL. Es bien sabido que el colesterol incrementa los parámetros de orden de los lípidos, específicamente de los grupos

acilo, esto permite baja movilización descontrolada de las proteínas de membrana. Es probable que ante la inhibición de la salida del colesterol que hemos observado, la membrana del espermatozoide se mantenga en un estado de rigidez. Este estado rígido podría interferir en la movilización de moléculas necesarias durante la capacitación. La falta de dinamismo podría causar que no funcionen de manera correcta las proteínas de transporte a través de la membrana como los canales iónicos o bombas. Podría ser la causa del motivo de que en este trabajo no ocurrió la entrada de Ca^{2+} por parte del ionóforo A23187 ya que al estar tan rígida la membrana no fue posible su integración o incrustación a ella para realizar su función de transportar Ca^{2+} . Este efecto puede ser similar ante la adición del ionóforo de K^+ cuando quisimos evaluar el Emv.

El glicocálix del espermatozoide es más grueso que otras células somáticas debido a su importancia durante los procesos de capacitación y RA (Schröter, S *et al.*, 1999). La unión de L-fucosa a la MP periacrosomal del espermatozoide de bovino, entre otros residuos de carbohidratos es importante para el reconocimiento de las células epiteliales oviductales y para fertilizar el óvulo (Lefebvre *et al.*, 1997). Un estudio demostró que los residuos de L-fucosa, analizados por citometría de flujo, disminuyeron con respecto a los no capacitados durante la capacitación y la RA del espermatozoide de cerdo (Jiménez *et al.* 2003). En este trabajo se observó que L-fucosa requiere de estar presente en la zona apical del espermatozoide no capacitado, posiblemente para la misma función. Al momento de capacitarse, los residuos de L-fucosa se redistribuyen hacia la zona de la región ecuatorial, esta distribución posiblemente surge para el espermatozoide pueda despegarse del oviducto y poder migrar hacia al ovocito y poder fertilizarlo. Durante la exposición de ambos tóxicos la

redistribución de L-fucosa se modificó por lo que PFOS y PFOA podrían afectar directamente el poder fecundante de los espermatozoides. Por otra parte, la flotilina es un marcador de los MDM, durante este estudio la flotilina tuvo cambios en su reorganización cuando los espermatozoides se expusieron a PFAS; recordemos que los MDM o lipid rafts son ricos en colesterol y se mueven a través de la membrana para mayor disponibilidad de interacción entre moléculas. Las PFAS al tener la propiedad de condensación en la membrana podrían afectar este dinamismo y así evitar la correcta redistribución necesaria para que se lleve a cabo la capacitación espermática como un efecto de la disfunción y daño membranal. La remodelación del citoesqueleto de actina también se alteró cuando los espermatozoides se expusieron a PFOS y PFOA, ya que hubo una polimerización más significativa de actina-F durante la capacitación. Este aumento no ocurrió bajo la exposición a PFOS y PFOA. En varios estudios, el PFOS indujo la interrupción de la barrera hematotesticular que afectó la organización de la actina-F a través de la vía p-FAK-Tyr407 (Chen *et al.* 2017; Mao *et al.* 2018; Wan *et al.* 2014). Puede ser que PFOS actúe inhibiendo a FAK en los espermatozoides, lo que permite inhibir la polimerización de la actina, generando así daño membranal.

PFOS y PFOA son los perfluorados más estudiados, debido a que desde la década de los años 50 han sido los más producidos por las compañías como 3M y DuPont de manera masiva. Se les ha atribuído numerosos efectos de daño en comparación con las PFAS de cadena más corta. Un estudio realizado en ratas ha demostrado que las PFCs de cadena más corta se eliminan más rápidamente que las de cadenas largas, relacionándose su tiempo de eliminación con el daño ocasionado (Yeung *et al.* 2009). A pesar de que ambos compuestos poseen 8 átomos de carbono y que poseen gran

similitud en su estructura química, es de gran interés la diferencia que tienen estos compuestos en sus efectos hacia los espermatozoides. El efecto de PFOS es similar al de PFOA pero con menor impacto. Esta diferencia puede ser debida al número de F en la cadena hidrocarbonada, el F es el elemento más electronegativo de la tabla periódica, PFOS contiene 17 F mientras que PFOA tiene 15. Además se ha observado que PFOS es menos hidrofílico que PFOA, pudiendo explicar el aumento en el grosor de la bicapa lipídica observado en los estudios *in silico*.

Todos estos estudios en conjunto se relacionan entre sí soportando la presencia de daño a nivel membranal afectando el reordenamiento de moléculas importantes para que se lleve a cabo la capacitación y la RA, el modelo propuesto se resume en la figura 25. Sin embargo, aún se requieren datos adicionales experimentales para dilucidar y corroborar por completo este mecanismo de daño.

Figura 25. Modelo propuesto de daño de PFOS y PFOA sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo. A) Capacitación espermática en ausencia de PFAS.

Tras el correcto eflujo del colesterol por parte de los aceptores de esteroides como la BSA o HDL se lleva a cabo el transporte equilibrado de Ca^{2+} mediado por los canales Catsper o PMCA4 (bomba de Ca^{2+} ATPasa) y permite que exista un ligero incremento de Ca^{2+} fisiológico para que ocurra con éxito la capacitación y la RA. También ocurre la correcta redistribución de moléculas en la membrana necesarias para la señalización durante la capacitación, RA y fertilización. Los MDM marcados con flotilina-1 se distribuyen hacia la zona apical de la cabeza del espermatozoide. L-fucosa, en su mayoría, deja de estar expuesta como parte de su integración en las glicoproteínas de membrana. Hay una correcta polimerización de F-actina en la cabeza del espermatozoide. **B)** Capacitación espermática en presencia de PFAS. Debido a la literatura, se propone que PFOS y PFOA aumentan el grosor de la bicapa lipídica incrustándose de manera automática y espontánea, generando un efecto de condensación parecido al colesterol. El eflujo del colesterol necesario para la capacitación fue inhibido, por lo que, la membrana se vuelve aún más rígida y menos fluida, posiblemente por el incremento de las EROS por parte de PFOS y a la falta de la actividad de los aceptores de esteroides como las HDL o el BSA. Cuando se intentó inducir el transporte de los iones K^+ y Ca^{2+} mediante valinomicina y el ionóforo A23187, el daño por PFAS provocó que no hubiera un correcto transporte de los iones posiblemente debido a que ninguno de los ionóforos pudo integrarse debido a la rigidez de la membrana. Según nuestros resultados hay presencia de daño y disfunción de la membrana plasmática. Debido a la disrupción membranal, a la falta de un gradiente de concentración, así como, a la liberación de Ca^{2+} desde los compartimientos internos, se presentó una acumulación excesiva de Ca^{2+} intracelular a las 3 h de capacitación. Las PFAS afectaron la conductancia de la membrana lipídica mediada por valinomicina alterando el potencial de membrana. La rigidez en la membrana provoca que las moléculas (glicoproteínas y MDM) no se distribuyan correctamente para su señalización, importante para los procesos de capacitación y RA. Así como, se inhibió la polimerización de F-actina quedando únicamente los monómeros de G-actina.

Conclusiones

En el presente estudio se observó que PFOS y PFOA alteraron la funcionalidad e integridad de la MP durante la capacitación de espermatozoides de cerdo *in vitro*. Nuestros resultados indican que PFOS y PFOA producen disfunción de la MP, así como daño en la fisiología de los espermatozoides de cerdo, particularmente en los procesos relacionados con la capacitación. Esta propuesta se sustenta en:

- 1) Acumulación de Ca^{2+} , marcador de la ausencia de un control adecuado de influjos de Ca^{2+} realizado por los transportadores de Ca^{2+} del espermatozoide.
- 2) Alteración de la Emv, ya que los espermatozoides no respondieron al estímulo de valinomicina y KCl.
- 3) Alteración de la MP, ya que la prueba HOS mostró que la membrana no era sensible a soluciones hiposmóticas.
- 4) Inhibición de la salida de colesterol de la MP por las PFAS.
- 5) Reorganización de MDM y citoesqueleto de actina que es inhibida por los compuestos perfluorados.

El daño directo que se produce a nivel de la MP, cuya correcta funcionalidad es fundamental para los procesos relacionados con la capacitación y la RA, requiere un mayor estudio para determinar los efectos precisos de estos compuestos perfluorados sobre la fisiología espermática.

Referencias bibliográficas

- Abudayyak, M., E. Öztaş, y G. Özhan. 2021. "Determination of Perfluorooctanoic Acid Toxicity in a Human Hepatocarcinoma Cell Line." *J Health Pollut* 11 (31):210909. doi: 10.5696/2156-9614-11.31.210909.
- Alexander, Bruce H y Geary W Olsen. 2007. "Bladder cancer in perfluorooctanesulfonyl fluoride manufacturing workers." *Annals of epidemiology* 17 (6):471-478.
- Anderko, L., y E. Pennea. 2020. "Exposures to per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS): Potential risks to reproductive and children's health." *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 50 (2):100760. doi: 10.1016/j.cppeds.2020.100760.
- Andersen, Melvin E, John L Butenhoff, Shu-Ching Chang, David G Farrar, Gerald L Kennedy, Christopher Lau, Geary W Olsen, Jennifer Seed y Kendall B Wallace. 2008. "Perfluoroalkyl acids and related chemistries—toxicokinetics and modes of action." *Toxicological sciences* 102 (1):3-14.
- ATSDR. 2015. "Resumen de salud pública perfluoroalquilos." <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>.
- Bainbridge, R. E. y A. E. Carlson. 2019. "Tiny Dancer: EFCAB9 Triggers Sperm Hyperactivation via CatSper." *Trends Biochem Sci* 44 (10):823-826. doi: 10.1016/j.tibs.2019.08.001.
- Ball, Barry A, Anthony T Vo y Julie Baumber. 2001. "Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa." *American journal of veterinary research* 62 (4):508-515.
- Björndahl, L., I. Söderlund y U. Kvist. 2003. "Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment." *Hum Reprod* 18 (4):813-6. doi: 10.1093/humrep/deg199.
- Boerke, A., J. F. Brouwers, V. M. Olkkonen, C. H. van de Lest, E. Sostaric, E. J. Schoevers, J. B. Helms y B. M. Gadella. 2013. "Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization." *Biol Reprod* 88 (1):21. doi: 10.1095/biolreprod.112.101253.
- Boerke, A., P. S. Tsai, N. Garcia-Gil, I. A. Brewis y B. M. Gadella. 2008. "Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction." *Theriogenology* 70 (8):1188-1196. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.021.
- Campuzano, Alejandro Domínguez. 2014. "Efecto del sulfonato de perfluorooctano PFOS en las uniones comunicantes de los COCs porcinos durante la maduración in vitro (MIV)." Maestría, Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Cassone, Cristina G, Viengtha Vongphachan, Suzanne Chiu, Kim L Williams, Robert J Letcher, Eric Pelletier, Doug Crump y Sean W Kennedy. 2012. "In ovo effects of perfluorohexane sulfonate and perfluorohexanoate on pipping success, development, mRNA expression and thyroid hormone levels in chicken embryos." *Toxicological Sciences*:kfs072.
- Celeghini, E. C. C., J. Nascimento, C. F. Raphael, A. F. C. Andrade y R. P. Arruda. 2010. "Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62:536-543. doi:
- Chen, Haiqi, Ying Gao, Dolores D. Mruk, Xiang Xiao, Constance M. John, Paul J. Turek, Wing-ye Lui, Will M. Lee, Bruno Silvestrini y C. Yan Cheng. 2017. "Rescue of PFOS-induced human Sertoli cell injury by overexpressing a p-FAK-Y407E phosphomimetic mutant." *Scientific Reports* 7 (1). doi: 10.1038/s41598-017-15671-4.
- Chen, N., J. Li, D. Li, Y. Yang y D. He. 2014. "Chronic exposure to perfluorooctane sulfonate induces behavior defects and neurotoxicity through oxidative damages, in vivo and in vitro." *PLoS One* 9 (11):e113453. doi: 10.1371/journal.pone.0113453.

- Choi, Y. H. y Y. Toyoda. 1998. "Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium." *Biol Reprod* 59 (6):1328-33. doi: 10.1095/biolreprod59.6.1328.
- De La Vega-Beltran, Jose Luis, Claudia Sánchez-Cárdenas, Darío Krapf, Enrique O. Hernandez-González, Eva Wertheimer, Claudia L. Treviño, Pablo E. Visconti y Alberto Darszon. 2012. "Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome Reaction." *Journal of Biological Chemistry* 287 (53):44384-44393. doi: 10.1074/jbc.M112.393488.
- Demarco, Ignacio A., Felipe Espinosa, Jennifer Edwards, Julian Sosnik, José Luis de la Vega-Beltrán, Joel W. Hockensmith, Gregory S. Kopf, Alberto Darszon y Pablo E. Visconti. 2003. "Involvement of a Na⁺/HCO Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation." *Journal of Biological Chemistry* 278 (9):7001-7009. doi: 10.1074/jbc.M206284200.
- Donley, G. M., E. Taylor, Z. Jeddy, G. Namulanda y T. J. Hartman. 2019. "Association between in utero perfluoroalkyl substance exposure and anti-Müllerian hormone levels in adolescent females in a British cohort." *Environ Res* 177:108585. doi: 10.1016/j.envres.2019.108585.
- EPA, U. 2012. "Emerging contaminants-perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluoro-octanoic acid (PFOA)." *Emerging contaminants fact sheet—PFOS and PFOA*.
- Eriksen, K. T., O. Raaschou-Nielsen, J. K. McLaughlin, L. Lipworth, A. Tjønneland, K. Overvad y M. Sørensen. 2013. "Association between plasma PFOA and PFOS levels and total cholesterol in a middle-aged Danish population." *PLoS One* 8 (2):e56969. doi: 10.1371/journal.pone.0056969.
- Fei, Chunyuan, Joseph K McLaughlin, Loren Lipworth y Jørn Olsen. 2009. "Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity." *Human Reproduction*.
- Florman, Harvey M y Tom Ducibella. 2006. "Fertilization in mammals." *Knobil and Neill's physiology of reproduction* 3:55-112.
- Forum, United States. Environmental Protection Agency. Risk Assessment. 2005. "Guidelines for carcinogen risk assessment."
- França, L. R., G. F. Avelar y F. F. Almeida. 2005. "Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs." *Theriogenology* 63 (2):300-18. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.014.
- Gadella, Barend M y Carolina Luna. 2014. "Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface." *Theriogenology* 81 (1):74-84.
- Garner, D. L. y E. Hafez, S .E. . 1993. "Spermatozoa and seminal plasma." In *Reproduction in Farm Animals.*, edited by E. S. E. Hafez, 165-187. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Giesy, John P y Kurunthachalam Kannan. 2001. "Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife." *Environmental science & technology* 35 (7):1339-1342.
- Harper, M-E, L Bevilacqua, K Hagopian, R Weindruch y Jon J Ramsey. 2004. "Ageing, oxidative stressy mitochondrial uncoupling." *Acta Physiologica Scandinavica* 182 (4):321-331.
- Henkel, R., D. R. Franken y U. F. Habenicht. 1998. "Zona pellucida as physiological trigger for the induction of acrosome reaction." *Andrologia* 30 (4-5):275-80. doi: 10.1111/j.1439-0272.1998.tb01171.x.
- Hernández-González, E. O., A. N. Lecona-Valera, J. Escobar-Herrera y A. Mújica. 2000. "Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa." *Cell Motil Cytoskeleton* 46 (1):43-58. doi: 10.1002/(sici)1097-0169(200005)46:1<43::aid-cm5>3.0.co;2-1.
- Hirohashi, N. y R. Yanagimachi. 2018. "Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization." *Biol Reprod* 99 (1):127-133. doi: 10.1093/biolre/iyoy045.
- Ho, H. C. 2010. "Redistribution of nuclear pores during formation of the redundant nuclear envelope in mouse spermatids." *J Anat* 216 (4):525-32. doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01204.x.

- Ho, H. C. y S. S. Suarez. 2003. "Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility." *Biol Reprod* 68 (5):1590-6. doi: 10.1095/biolreprod.102.011320.
- Hundley, SG, AM Sarrif y GL Kennedy Jr. 2006. "Absorption, distribution y excretion of ammonium perfluorooctanoate (APFO) after oral administration to various species." *Drug and chemical toxicology* 29 (2):137-145.
- Jack, Westin. 2022. Ovum and Sperm. edited by Mature Sperm Estrucure.
- Jaiswal, B. S., M. Eisenbach y I. Tur-Kaspa. 1999. "Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use?" *Mol Hum Reprod* 5 (3):214-9. doi: 10.1093/molehr/5.3.214.
- Jiménez, I., R. Fierro, H. González-Márquez, G. Mendoza-Hernández, S. Romo y M. Betancourt. 2006. "Carbohydrate affinity chromatography indicates that arylsulfatase-A from capacitated boar sperm has mannose and N-acetylglucosamine/sialic acid residues." *Arch Androl* 52 (6):455-62. doi: 10.1080/01485010600694690.
- Jiménez, I., H. Gonzalez-Marquez, R. Ortiz, M. Betancourt, J. Herrera y R. Fierro. 2002. "Expression of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boars by flow cytometry." *Arch Androl* 48 (2):159-66. doi: 10.1080/014850102317267481.
- Jiménez, Irma, Humberto González-Márquez, Rocío Ortiz, José Antonio Herrera, Adelfa García, Miguel Betancourt y Reyna Fierro. 2003. "Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa." *Theriogenology* 59 (5):1171-1180.
- Joensen, U. N., B. Veyrand, J. P. Antignac, M. Blomberg Jensen, J. H. Petersen, P. Marchand, N. E. Skakkebaek, A. M. Andersson, B. Le Bizec y N. Jorgensen. 2013. "PFOS (perfluorooctanesulfonate) in serum is negatively associated with testosterone levels, but not with semen quality, in healthy men." *Hum Reprod* 28 (3):599-608. doi: 10.1093/humrep/des425.
- Joensen, Ulla Nordström, Rossana Bossi, Henrik Leffers, Allan Astrup Jensen, Niels E Skakkebaek y Niels Jørgensen. 2009. "Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality?" *Environmental health perspectives* 117 (6):923.
- Khalil, Maroun Bou, Krittalak Chakrabandhu, Hongbin Xu, Wattana Weerachatanukul, Mary Buhr, Trish Berger, Euridice Carmona, Ngoc Vuong, Premkumari Kumarathan, Patrick T. T. Wong, Danielle Carrier y Nongnuj Tanphaichitr. 2006. "Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid." *Developmental Biology* 290 (1):220-235. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.11.030.
- Kim, Young Ran, Nicole White, Jennifer Bräunig, Soumini Vijayarathy, Jochen F. Mueller, Christine L. Knox, Fiona A. Harden, Rosana Pacellay Leisa-Maree L. Toms. 2020. "Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFASs) in follicular fluid from women experiencing infertility in Australia." *Environmental Research* 190:109963. doi: 10.1016/j.envres.2020.109963.
- Lau, Christopher, Katherine Anitole, Colette Hodes, David Laiyrea Pfahles-Hutchens y Jennifer Seed. 2007. "Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings." *Toxicological sciences* 99 (2):366-394.
- Laude, A. J. y I. A. Prior. 2004. "Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking." *Mol Membr Biol* 21 (3):193-205. doi: 10.1080/09687680410001700517.
- Leahy, T. y B. M. Gadella. 2015. "New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane." *Asian J Androl* 17 (4):561-7. doi: 10.4103/1008-682X.153309.
- Lefebvre, R., M. C. Lo y S. S. Suarez. 1997. "Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition." *Biol Reprod* 56 (5):1198-204. doi: 10.1095/biolreprod56.5.1198.
- Liu, Chunsheng, Yongbing Du y Bingsheng Zhou. 2007. "Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in

- primary cultured tilapia hepatocytes." *Aquatic Toxicology* 85 (4):267-277. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.09.009.
- Liu, Gesheng, Shuai Zhang, Kun Yang, Lihong Zhu y Daohui Lin. 2016. "Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to *Escherichia coli*: Membrane disruption, oxidative stress, and DNA damage induced cell inactivation and/or death." *Environmental Pollution* 214:806-815. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.089.
- Liu, Min. 2016. "Capacitation-associated glycocomponents of mammalian sperm." *Reproductive sciences* 23 (5):572-594.
- Maldonado-García, Deneb, Monica L. Salgado-Lucio, Ana L. Roa-Espitia, Tania Reyes-Miguel y Enrique O. Hernández-González. 2017. "Calpain inhibition prevents flotillin re-ordering and Src family activation during capacitation." *Cell and Tissue Research* 369 (2):395-412. doi: 10.1007/s00441-017-2591-2.
- Mao, Baiping, Dolores Mruk, Qingquan Lian, Renshan Ge, Chao Li, Bruno Silvestrini y C. Yan Cheng. 2018. "Mechanistic Insights into PFOS-Mediated Sertoli Cell Injury." *Trends in Molecular Medicine* 24 (9):781-793. doi: 10.1016/j.molmed.2018.07.001.
- Mata-Martínez, E., O. José, P. Torres-Rodríguez, A. Solís-López, A. A. Sánchez-Tusie, Y. Sánchez-Guevara, M. B. Treviño y C. L. Treviño. 2013. "Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging." *J Vis Exp* (75):e50344. doi: 10.3791/50344.
- Maxfield, F.R. 2002. "Plasma membrane microdomains. ." *Current opinion in cell biology* 14:483-487. doi: doi: 10.1016/s0955-0674(02)00351-4.
- Milesi, V. y P. Mobili. 2019. *Fisiología celular: señales y respuestas* . Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Milesi, V. y M. Moncada. 2019. "Potencial de membrana." In *Fisiología celular: señales y respuestas*, edited by V. Milesi and P. Mobili, 49-75. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Murphy, Michael P. 2009. "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochemical Journal* 417 (1):1-13.
- Okabe, Masaru. 2016. "The Acrosome Reaction: A Historical Perspective." In *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*, edited by M. Buffone. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Springer, Cham.
- Olsen, G. W., J. M. Burris, D. J. Ehresman, J. W. Froehlich, A. M. Seacat, J. L. Butenhoff y L. R. Zobel. 2007. "Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers." *Environ Health Perspect* 115 (9):1298-305.
- Ortiz-Sánchez, PB. 2017. "Efecto de los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS sobre la capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides de cerdo in vitro." Maestría, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Oseguera-López, Iván, Serafín Pérez-Cerezales, Paola Berenice Ortiz-Sánchez, Oscar Mondragon-Payne, Raúl Sánchez-Sánchez, Irma Jiménez-Morales, Reyna Fierro y Humberto González-Márquez. 2020. "Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) Alters Protein Phosphorylation, Increase ROS Levels and DNA Fragmentation during In Vitro Capacitation of Boar Spermatozoa." *Animals* 10 (10):1934. doi: 10.3390/ani10101934.
- Patrat, C., C. Serres y P. Jouannet. 2000. "The acrosome reaction in human spermatozoa." *Biol Cell* 92 (3-4):255-66. doi: 10.1016/s0248-4900(00)01072-8.
- Peropadre, Ana, Maria José Hazen, José Manuel Pérez Martín y Paloma Fernández Freire. 2020. "An acute exposure to perfluorooctanoic acid causes non-reversible plasma membrane injury in HeLa cells." *Environmental Pollution* 260:114008. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114008.

- Pimentel-González, DJ., R.G. Campos-Montiel, M.E. Cisneros-Ortiz, O.A. Monroy-Hermosillo y E.J. Vernon-Carter. 2009. "Efecto de componentes del sistema de emulsiones múltiples en el consumo del contaminante MTBE por un consorcio microbiano." *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica* 1 (3).
- Pond, Wilson G y Katherine A Houpt. 1978. *The biology of the pig*: Cornell University Press.
- Prevedouros, Konstantinos, Ian T Cousins, Robert C Buck y Stephen H Korzeniowski. 2006. "Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates." *Environmental science & technology* 40 (1):32-44.
- Roa-Espitia, Ana L., Eva R. Hernández-Rendón, Rafael Baltiérrez-Hoyos, Rafaela J. Muñoz-Gotera, Antonieta Cote-Vélez, Irma Jiménez, Humberto González-Márquez y Enrique O. Hernández-González. 2016. "Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation." *Biology Open* 5 (9):1189-1199. doi: 10.1242/bio.017558.
- Romarowski, A., G. M. Luque, F. A. La Spina, D. Krapf y M. G. Buffone. 2016. "Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis." In *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*, edited by M Buffone, 129-44. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Springer, Cham.
- Schröter, S., C. Osterhoff, W. McArdle y R. Ivell. 1999. "The glycocalyx of the sperm surface." *Hum Reprod Update* 5 (4):302-13. doi: 10.1093/humupd/5.4.302.
- Shen, Z., J. Ge, H. Ye, S. Tang y Y. Li. 2020. "Cholesterol-like Condensing Effect of Perfluoroalkyl Substances on a Phospholipid Bilayer." *J Phys Chem B* 124 (26):5415-5425. doi: 10.1021/acs.jpcc.0c00980.
- Sierra Vargas, Martha Patricia, Guzmán Grenfell, Alberto Martín, Ivonne Olivares Corichi, Yessica Dorin Torres Ramos y Juan José Hicks Gómez. 2004. "Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares." *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 17 (2):135-148.
- Silvestre, Mario Teteltitla. 2014. "Evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcinos expuestos a sulfonato de perfluorooctano (PFOS) in vitro." Maestría, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Suarez, S. S. y A. A. Pacey. 2006. "Sperm transport in the female reproductive tract." *Hum Reprod Update* 12 (1):23-37. doi: 10.1093/humupd/dmi047.
- Sutovsky, P., & Manandhar. G. 2006. "Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis." In *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration.*, edited by Cambridge: Cambridge University Press., 1-30
- Sánchez, Paola Berenice Ortiz. 2017a. "Efecto de los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS sobre la capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides de cerdo in vitro." Maestría, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Tilney, L. G., Y. Fukui y D. J. DeRosier. 1987. "Movement of the actin filament bundle in Mytilus sperm: a new mechanism is proposed." *J Cell Biol* 104 (4):981-93. doi: 10.1083/jcb.104.4.981.
- Toft, Gunnar, BAG Jönsson, CH Lindh, Aleksander Giwercman, M Spano, D Heederik, V Lenters, R Vermeulen, Lars Rylander y HS Pedersen. 2012. "Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in Arctic and European populations." *Human reproduction*:des185.
- Travis, A. J. y G. S. Kopf. 2002. "The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa." *J Clin Invest* 110 (6):731-6. doi: 10.1172/JCI16392.
- Turner, R. M. 2003. "Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?" *J Androl* 24 (6):790-803. doi: 10.1002/j.1939-4640.2003.tb03123.x.

- United Nations Environment Program (UNEP). 2009. Independent Environmental Assessment: Beijing 2008 Olympic Games. In *U.N. Environ. Programme, Nairobi, Kenya*.
- van Gestel, R. A., I. A. Brewis, P. R. Ashton, J. B. Helms, J. F. Brouwers y B. M. Gadella. 2005. "Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells." *Mol Hum Reprod* 11 (8):583-90. doi: 10.1093/molehr/gah200.
- Vasen, Gustavo, Maria Agustina Battistone, Diego O Croci, Nicolás G Brukman, Mariana Weigel Muñoz, Juan C Stupirski, Gabriel A Rabinovich y Patricia S Cuasnicú. 2015. "The galectin-1–glycan axis controls sperm fertilizing capacity by regulating sperm motility and membrane hyperpolarization." *The FASEB Journal* 29 (10):4189-4200.
- Visconti, Pablo E, Janice L Bailey, Grace D Moore, Dieyun Pan, Patricia Olds-Clarke y Gregory S Kopf. 1995. "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." *Development* 121 (4):1129-1137.
- Wan, H. T., D. D. Mruk, C. K. Wong y C. Y. Cheng. 2014. "Perfluorooctanesulfonate (PFOS) perturbs male rat Sertoli cell blood-testis barrier function by affecting F-actin organization via p-FAK-Tyr(407): an in vitro study." *Endocrinology* 155 (1):249-62. doi: 10.1210/en.2013-1657.
- Wang, Hexing, Hongyi Du, Jiaqi Yang, Hong Jiang, Karmin O, Linji Xu, Shuping Liu, Jianping Yi, Xu Qian, Yue Chen, Qingwu Jiang y Gengsheng He. 2019. "PFOS, PFOA, estrogen homeostasis, and birth size in Chinese infants." *Chemosphere* 221:349-355. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.061.
- Ward, C. R. y B. T. Storey. 1984. "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay." *Dev Biol* 104 (2):287-96. doi: 10.1016/0012-1606(84)90084-8.
- Wassarman, P. M. 1999. "Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis y fusion." *Cell* 96 (2):175-83. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80558-9.
- Wu, Jui-Te, Kai-Chieh Chiang y Feng-Pang Cheng. 2006. "Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa." *Animal Reproduction Science* 93 (1-2):34-45. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.007.
- Yanagimachi, R. 1994. "Mammalian Fertilization Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion." In *Physiology of reproduction*, edited by Knobil and Neill's, 189-317. Raven Place, New York.
- Yeung, L. W., E. I. Loi, V. Y. Wong, K. S. Guruge, N. Yamanaka, N. Tanimura, J. Hasegawa, N. Yamashita, S. Miyazaki y P. K. Lam. 2009. "Biochemical responses and accumulation properties of long-chain perfluorinated compounds (PFOS/PFDA/PFOA) in juvenile chickens (*Gallus gallus*)." *Arch Environ Contam Toxicol* 57 (2):377-86. doi: 10.1007/s00244-008-9278-3.
- Zeng, Y., E. N. Clark y H. M. Florman. 1995. "Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion." *Dev Biol* 171 (2):554-63. doi: 10.1006/dbio.1995.1304.
- Šabovič, I., I. Cosci, L. De Toni, A. Ferramosca, M. Stornaiuolo, A. Di Nisio, S. Dall'Acqua, A. Garolla y C. Foresta. 2019. "Perfluoro-octanoic acid impairs sperm motility through the alteration of plasma membrane." *Journal of Endocrinological Investigation* 43 (5):641-652. doi: 10.1007/s40618-019-01152-0.
- Šichtař, Jiří, Filipa Bubeníčková, Jitka Sirohi y Ondřej Šimoník. 2019. "How to Increase Post-Thaw Semen Quality in Poor Freezing Stallions: Preliminary Results of the Promising Role of Seminal Plasma Added after Thawing." *Animals* 9 (7):414. doi: 10.3390/ani9070414.

Productos derivados de este trabajo de tesis

Congresos nacionales e internacionales:

- 2019. 5th Latin American Congress of Glycobiology and 2nd Meeting of the Glycoscience in Health Thematic Network. "Redistribution of L-fucose residues in pig spermatozoa exposed to the perfluorated compounds PFOS and PFOA *in vitro*".
- 2019. XLIV Reunión Anual de AIBIR (Investigación Académica en Biología de la Reproducción A.C). "Los compuestos perfluorados PFOS y PFOA dañan la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo capacitados *in vitro*".

Artículo publicado:

- 2022. "Perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid induce plasma membrane dysfunction in boar spermatozoa during *in vitro* capacitation". Paola Berenice Ortiz-Sánchez, Ana L. Roa-Espitia, Reyna Fierro, Aideé S. López-Torres, Irma Jiménez-Morales, Iván Oseguera-López, Enrique O. Hernández-González and Humberto González-Márquez. *Reproductive Toxicology*, 110, 85-96.

Participación en artículo de investigación:

- 2020. "Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorohexane sulfonate (PFHXS) alters protein phosphorylation, increase ROS levels and DNA fragmentation during *in vitro* capacitation of boar spermatozoa". Iván Oseguera-López, Serafín Pérez-Cerezales†, Paola Berenice Ortiz-Sánchez, Oscar Mondragon-Payne, Raúl Sánchez-Sánchez, Irma Jiménez-Morales, Reyna Fierro and Humberto González-Márquez. *Animals* 10(10), 1934.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00131

Matrícula: 2173805959

Mecanismos del daño de los compuestos perfluorados PFOS y PFOA en espermatozoides de cerdo *in vitro*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 26 del mes de agosto del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
- DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ
- DR. MARCO ALLAN PEREZ SOLIS
- DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ
- DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: PAOLA BERENICE ORTIZ SANCHEZ

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

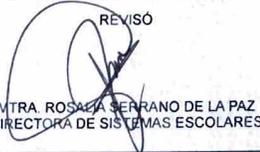
Aprobar

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



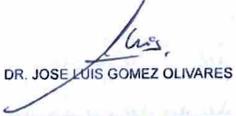
PAOLA BERENICE ORTIZ SANCHEZ
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



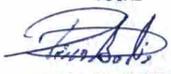
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL



DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ

VOCAL



DR. MARCO ALLAN PEREZ SOLIS

VOCAL



DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

SECRETARIA



DRA. IRMA JIMENEZ MORALES