

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Efecto de los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS en la capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides de cerdo *in vitro*.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

L.BF. Paola Berenice Ortiz Sánchez

Directora: Dra. Irma Jiménez Morales

Asesora: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana.

Asesora: Dra. Elia Roldán Reyes

28 de agosto del 2017

“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 593020, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Efecto de los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS en la capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides de cerdo *in vitro*", que presentó Paola Berenice Ortiz Sánchez el día 28 de agosto del año 2017.

Presidente: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana



Laboratorio de Andrología, S-257, Departamento Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Secretario: Dra. Elia Roldán Reyes



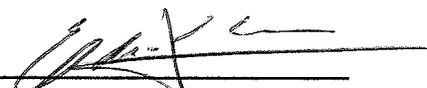
Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal 1: Dra. Edith Arenas Ríos



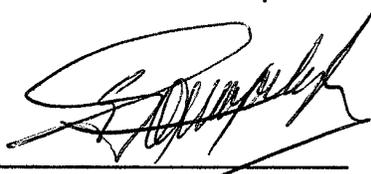
Laboratorio de Reproducción Animal Asistida, S-234. Departamento de Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Vocal 2: Dr. Eduardo Casas Hernández



Laboratorio de Biología Celular, S-252. Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Vocal 3: Dr. Humberto González Márquez



Laboratorio de Expresión Génica, S-248. Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Miembros del comité tutorial

Directora: Dra. Irma Jiménez Morales

Laboratorio de Andrología, Departamento Ciencias de la Salud, UAMI



Firma

Asesora: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Laboratorio de Andrología, Departamento Ciencias de la Salud, UAMI



Firma

Asesora: Dra. Elia Roldán Reyes

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, FES-Zaragoza, UNAM



Firma

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer infinitamente el apoyo que se me dio a todas aquellas personas que me han recibido con los brazos abiertos desde que llegué a la Ciudad de México. Me permitieron conocer un mundo mucho más allá de lo que creí que existía.

En especial muchas gracias a la Dra. Irma y a la Dra. Reyna por abrirme las puertas del laboratorio y al Dr. Humberto muchas gracias por guiarme siempre. Ustedes se han convertido no sólo en mis tutores, han sido para mí un ejemplo de vida. De todo corazón les digo que son los mejores jefes que alguien puede tener.

A la Dra. Elia Roldán muchísimas gracias por todos sus buenos consejos y apoyo con este proyecto, por su gran disponibilidad y amabilidad.

Quiero agradecer al grupo mueganito: Oscar, Leslye, Iván, Annel y Holy que no sólo han sido los mejores compañeros de laboratorio, también han sido mis más grandes y mejores amigos. He aprendido tanto de ustedes, me han enseñado la combinación de lealtad, compañerismo, ciencia y diversión. Gracias por las tardes de café ante días de mucho, mucho trabajo.

A mis compañeros de la maestría, gracias por hacer de las clases algo que en verdad disfruté.

A mis profesores de la maestría, no pude tener mejores profesores.

A los miembros del jurado, por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo y evaluarme.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis principalmente a dos personas. Ellos, que desde cuando aún no sabía caminar y hablar, creyeron en mí. Que guiaron mis pasos y dieron todo para que yo pudiera llegar a ser lo que soy. Que a pesar de que dieron todo por mí aun así me dejaron volar al final. A mis padres Lourdes Sánchez y Pablo Ortiz.

Del mismo modo dedico esta tesis a mi hermana Griselda Ortiz que ante cualquier problema, siempre estuvo presente, no puede haber persona en quién confíe más que en ella. Gracias por todo el apoyo para que yo llegara hasta aquí y gracias a Alfredo Almendárez mi cuñado que cuida a mi familia, eres un excelente hombre.

A mis niños hermosos de San Luis, Dany, Fer y Marifer. El mayor sacrificio que he hecho durante estos dos años es estar lejos de ustedes, saber que crecen con bien y que son los mejores niños del mundo es mi motor para seguir adelante.

Al gran amor de mi vida Irving Rivera, gracias amor por apoyarme tanto desde ayudarme en instalar mi departamento, ir por mí o llevarme a S.L.P., llevarme al médico, por darme la mejor compañía nuestra perrita Danila, por ayudarme a conocer esta enorme ciudad, desvelarte conmigo, estudiar conmigo o estar siempre, siempre al pendiente de mí. No tengo palabras para agradecerte todo lo que he experimentado desde que te conocí. A tu mamá Rosa Guerrero por darme de comer y hacerme lonchecitos ricos, pero sobre todo por otorgarme una nueva familia junto con Damaris y nuestra bella ahijada Samari.

Y sobre todo a Dios, porque sólo él sabe por las batallas que me ha hecho pasar para ayudarme a madurar. Porque sólo él sabe ponerme en el momento correcto con la situación correcta.

Resumen

El espermatozoide es una célula haploide cuya función es fertilizar al ovocito para la formación del cigoto. El espermatozoide se capacita en el tracto femenino en donde adquiere el potencial de fertilizar el óvulo. Para esto, requiere llevar a cabo la reacción acrosomal (RA) que permite la liberación de enzimas útiles para la degradación de la zona pelúcida y así poder penetrar al óvulo. Se ha observado que la exposición a agentes tóxicos afecta la movilidad y la capacidad para llevar a cabo la RA ya que los gametos son células muy susceptibles a xenobióticos. Los compuestos perfluorados (PFCs, por sus siglas en inglés) son hidrocarburos de 5 a 9 átomos de carbono, se caracterizan por ser anfipáticos y tienen un amplio uso comercial; se pueden encontrar en ropa, detergentes, champú, teflón de utensilios de cocina, alfombras, productos de cuero, alimentos y hasta en el agua potable. Estudios en animales y humanos sugieren que existe una asociación entre los PFCs y las funciones reproductivas, sin embargo, el mecanismo por el cual sucede esta asociación es aún desconocido. También existe evidencia importante sobre la acumulación de compuestos perfluorados en animales y humanos. Los PFCs que se producen más son el sulfonato de perfluorooctano (PFOS), el ácido perfluorooctanoico (PFOA), el sulfonato de perfluorohexano (PFHxS), así como el ácido perfluorononanoico (PFNA). Los PFCs como PFOS y PFHxS se caracterizan por tener un potencial de acumulación alto uniéndose a proteínas séricas. El espermatozoide tiene un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, por lo que es sensible al daño oxidante, el cual es producido principalmente por Especies

Reactivas de Oxígeno (EROS). No existe mucha información acerca de PFHxS hoy en día pero se ha asociado con una disminución del colesterol y disminución de peso en ratas, se ha enlistado junto con otros perfluorados como un contaminante orgánico persistente. El presente estudio tuvo como objetivo conocer el efecto de los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS, en la capacitación y RA de espermatozoides de cerdo *in vitro*, así como los niveles de EROS intracelular. La capacitación, RA, movilidad, formación de aglutinados y niveles de EROS no fueron modificados en espermatozoides que fueron expuestos a PFHxS. Sin embargo, la capacitación, RA, movilidad y niveles de EROS disminuyeron en espermatozoides que fueron expuestos a PFOS; por el contrario, hubo un incremento en la formación de aglutinados.

ABSTRACT

The sperm is a haploid cell whose function is to fertilize the ovule for the formation of zygote. Sperm carries out the capacitation in the female tract where it acquires the capacity to fertilize the ovule. Requires carrying out the acrosomal reaction (AR) which allows the release of enzymes useful for degradation of the pellucid zone and thus be able to penetrate the oocyte. It has been observed to exposure to different toxic agents affects the motility and ability to carry out the AR since the gametes are very susceptible to several types of xenobiotics. The perfluorinated compounds (PFCs) are hydrocarbons of 5 to 9 carbon atoms and are characterized by being amphipatic and have wide commercial use, can be found in clothing, detergents, shampoo, Teflon cookware, carpets, leather products, food and even drinking water. Studies in animals and humans have suggested that there is an association between PFCs and reproductive functions, however, the mechanism by which this association happens is still unknown. There is also important evidence on the accumulation of PFCs in animals and humans. The PFCs of greater production are perfluorooctanesulfonic acid (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorohexane sulfonate (PFHxS) and perfluorononanoic acid (PFNA). The PFCs like PFOS and PFHxS are characterized by their high potential for accumulation after absorption by binding to serum proteins. The sperm has a high content of fatty acids so it is sensitive to oxidative damage by which is mainly produced by EROS. Not much is known about PFHxS today, but it has been associated with a decrease in cholesterol and weight loss in rats, has been listed along with other toxics as a persistent organic

pollutant. The present study aims to know the effect of the perfluorinated compounds PFHxS y PFOS, in the capacitation and acrosomal reaction of pig sperm *in vitro*, as well as the levels of intracellular EROS. The capacitation, AR, motility, formation of agglutinations and EROS levels were not modified in sperm that were exposed to PFHxS. Although the capacitation, AR, motility and EROS level decreased in spermatozoa that were exposed to PFOS; on the other hand, there was an increase in the formation of agglutinated spermatozoa rosettes as the concentration of PFOS increased, which affected its progressive motility.

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1	Infertilidad masculina y espermatozoide	1
1.2	1.2 Toxicología reproductiva	3
1.3	Compuestos perfluorados	4
1.4	1.4 El cerdo como modelo para la investigación biomédica.....	6
2	Antecedentes	7
2.1	2.1 Estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	7
2.2	Espermatozoides y EROS	8
3	Justificación.....	9
4	Pregunta de investigación	11
5	Hipótesis	11
6	Objetivo general	11
7	Objetivos particulares.....	11
8	Material y Métodos	12
8.1	Obtención de la muestra	12

8.2	Evaluación espermática.....	12
8.3	Cinética de Capacitación	13
8.4	Preparación de la muestra	13
8.5	Evaluación de la capacitación y RA con CTC	14
8.6	Determinación de la Concentración Letal media (CL ₅₀)	15
8.7	Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROS)	16
8.8	Análisis estadístico.....	17
9	Resultados	18
9.1	Patrones de capacitación (CTC)	18
9.2	Cinética de capacitación	18
9.3	Toxicidad de PFOS en los espermatozoides de cerdo <i>in vitro</i>	19
9.3.1	Concentración letal media (CL ₅₀) de PFOS	20
9.3.2	Efecto de PFOS sobre la movilidad espermática.....	22
9.3.3	Efecto de PFOS sobre la capacitación	24
9.3.4	Efecto 1/5 CL ₅₀ , 1/2 CL ₅₀ y CL ₅₀ de PFOS sobre la capacitación	25
9.3.5	Concentración de PFOS de inhibición media de la capacitación (CI ₅₀)	28

9.3.6	8.3.6 Concentración de PFOS de inhibición media (CI ₅₀) de la RA	29
9.3.7	Efecto de 1/5CL ₅₀ , 1/2CL ₅₀ y CL ₅₀ de PFOS sobre la movilidad espermática.....	29
9.3.8	Efecto de 1/5CL ₅₀ , 1/2CL ₅₀ y CL ₅₀ de PFOS sobre la viabilidad espermática.....	31
9.4	Toxicidad de PFHxS en los espermatozoides de cerdo <i>in vitro</i>	33
9.4.1	Efecto de PFHxS sobre la viabilidad espermática	33
9.4.2	Efecto de PFHxS sobre la capacitación y RA	35
9.4.3	Efecto de PFHxS sobre la movilidad y aglutinación espermática	37
9.5	Patrones de fluorescencia de DCF	42
10	Discusión.....	47
11	Conclusiones	53
12	Perspectivas	54
13	. Bibliografía.....	55

1. Introducción

El espermatozoide es el gameto masculino cuyo propósito es fertilizar al óvulo para producir un nuevo organismo. Existen tóxicos que pueden interferir con su función, provocando infertilidad, entre los que se encuentran los PFCs (Toft *et al.*, 2012). Este trabajo se enfocará en el efecto de dos PFCs en la capacitación y la reacción acrosomal (RA) del espermatozoide.

1.1 Infertilidad masculina y espermatozoide

Según la OMS, la infertilidad se define como la incapacidad para lograr un embarazo en parejas que llevan buscándolo por doce meses o más sin tener algún método anticonceptivo. Aqueja del 15 al 20% de las parejas que buscan tener un bebé, la causa se puede atribuir en el 40% de los casos a la mujer, 40%, al varón y en el 20% restante, a ambos o clasificarse como de origen desconocido. Se ha reportado hasta un 25% de infertilidad masculina, provocada por, inhalación o manipulación de químicos como plaguicidas en países de Centroamérica (OMS, 2007). Con el fin de comprender mejor la infertilidad masculina, se describirán los procesos que suceden en el gameto masculino antes de la fecundación.

El espermatozoide pasa por las etapas: maduración epididimal, capacitación y RA para poder fertilizar al óvulo (Gadella y Luna, 2014).

Cuando el espermatozoide entra en contacto con el tracto reproductor femenino, comienza el proceso de capacitación. Aquí suceden cambios en la membrana

espermática como: el aumento en su fluidez, cambio en la composición proteica, en la concentración de iones, en la localización de antígenos, cambio en el potencial de membrana, pérdida en la asimetría de fosfolípidos, lo cual deriva e un cambio en la movilidad espermática, llamada hiperactivación, cuyo propósito es encontrarse con el ovocito en el oviducto (Visconti *et al.*, 1995, Florman y Ducibella, 2006).

El extremo anterior del espermatozoide está cubierto por el acrosoma que es una vesícula secretora que contiene enzimas hidrolíticas necesarias para atravesar las capas de células que rodean al ovocito y poder fertilizarlo. El acrosoma consta de dos membranas interna y otra externa. La RA es un proceso de exocitosis en el que se fusiona la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza, se caracteriza por la formación de vesículas que contienen los dos dominios de membrana que se fusionaron; en este proceso se lleva a cabo la liberación de las enzimas hidrolíticas que se encuentran almacenadas en el acrosoma, lo cual, ayuda a que el espermatozoide pueda atravesar a la zona pelúcida (Florman y Ducibella, 2006).

El flagelo del espermatozoide se subdivide en pieza media, pieza principal y pieza terminal. En la pieza media se encuentran las mitocondrias, éstas últimas son orgánulos en los que se produce la energía metabólica y, junto con esto, se generan una gran cantidad de EROS. Las mitocondrias generan EROS por 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).

Algunas de las EROS pueden ser peróxidos, radical superóxido, radical hidroxilo y oxígeno singulete, por ejemplo, (H_2O_2 , $\bullet O_2^-$, $\bullet OH$) y especies reactivas de nitrógeno (NOS) como óxido nítrico (NO^\bullet); un desequilibrio en su concentración intracelular puede afectar la calidad y funcionalidad espermática (Sierra Vargas *et al.*, 2004). Sin embargo, la producción de EROS por el espermatozoide es un proceso fisiológico normal, pero un desequilibrio en su generación es perjudicial y se asocia con infertilidad masculina (Ball *et al.*, 2001).

Principales Especies Reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno

RADICALES		NO RADICALES	
Especies Reactivas de Oxígeno			
Superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2
Hidroxilo	OH^{\bullet}	Ácido hipocloroso	HOCL
Peroxi	RO_2^-	Ácido hipobromoso	HOBr
Alcoxi	RO^-	Ozono	O_3
Hidroperóxido	HO_2^-	Oxígeno singulete	O_2^{\bullet}
Especies Reactivas de Nitrógeno			
Óxido nítrico	NO_2	Dióxido de nitrógeno	NO_2
Ácido nitroso	HNO_2	Catión nitrosil	NO
		Anión nitrosil	NO^- NO^-
		Peroxinitrito	$ONOO^-$
		Ácido peroxinitroso	$ONOOH$
		Alquilperoxinitrito	$ROONO$

1.2 Toxicología reproductiva

Los xenobióticos son compuestos poco frecuentes en la naturaleza debido a que son sintetizados por el hombre. Incluyen insecticidas, herbicidas, surfactantes y muchos otros; su producción se ha incrementado y causan daño en el ambiente y a la salud.

La toxicología reproductiva es el estudio de los efectos adversos de alguna sustancia en los sistemas neuroendocrinos y reproductivos del embrión, el feto, el neonato, los mamíferos prepúberes y los adultos. Dentro de los xenobióticos se incluyen agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos y físicos. Un reprotóxico puede generar daño mediante los siguientes mecanismos: 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 (Pimentel-González *et al.*, 2009, Eriksen *et al.*, 2013). Muchos compuestos no presentan toxicidad aguda, sino que su efecto es más sutil, entre ellos se encuentran los compuestos perfluorados.

1.3 Compuestos perfluorados

Los PFCs son hidrocarburos con diferente número de átomos de carbono rodeados por átomos de flúor y algún grupo funcional como ácido carboxílico, sulfonato o amida por mencionar algunos ejemplos, y se encuentra situado en el extremo de la cadena de carbonos. Han sido sintetizados desde la década de 1950 y tienen la característica de que son anfipáticos, también pueden llegar a disminuir la tensión superficial del agua. Tienen un uso comercial amplio y se pueden encontrar en ropa, detergentes, champú, teflón de utensilios de cocina, alfombras, productos de cuero, alimentos y hasta en el agua potable. Su vida media es aproximadamente de 4 a 5 años en el organismo, lo que tiene un impacto importante tanto en seres humanos como en animales (Fei *et al.*, 2009). Los compuestos organofluorados contienen átomos de carbono y flúor unidos mediante enlaces covalentes y notablemente

polarizados, su enlace C-F le confiere persistencia en condiciones extremas que le permiten resistir a altas temperaturas o resistencia a bases o ácidos fuertes y también les permite descomponerse muy lentamente tanto en aire como en suelo (ATSDR, 2015). Los PFCs de mayor producción son PFOS, el ácido perfluorooctanoico (PFOA), PFHxS, así como el ácido perfluorononanoico (PFNA). En este trabajo se utilizarán PFHxS y PFOS.

El PFOS consta de una cadena de ocho átomos de carbono en el que los átomos de hidrógeno fueron reemplazados por átomos de flúor y por un grupo sulfonato para formar una estructura aniónica estable, que a su vez, puede formar una sal hidrosoluble y cristalina con metales como el litio, el sodio o el potasio, o con otros grupos catiónicos como el NH_4^+ (ATSDR, 2015). Su fórmula molecular es $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{SO}_3$. Con base en estudios ambientales y modelos teóricos en Europa y Norteamérica, se propone que las vías de mayor exposición para PFOS son la ingesta de alimentos contaminados, el agua, la contaminación del aire y la contaminación de manos a boca por tener contacto con alfombras tratadas (ATSDR, 2015).

El PFHxS es un compuesto de 6 átomos de C, se usa como surfactante para hacer fluoropolímeros de revestimientos protectores para alfombra, papel y textiles. Cabe recalcar que no se sabe mucho acerca de este compuesto perfluorado, se han realizado estudios en rata donde se observó que PFHxS disminuye el peso corporal, así como, los niveles de colesterol, sin embargo, no es considerado de alto riesgo por la Risk Assessment Advice (Sundström *et al.*, 2009) pero junto con PFOS y otros PFCs se ha enlistado como contaminantes orgánicos persistentes por la convención

de Estocolmo debido a su bioacumulación, persistencia y toxicidad (United Nations Environment Program (UNEP), 2009).

No hay información reciente acerca de la producción de los PFCs, ya que no hay obligación de reportarlos en EUA (Forum, 2005); el último reporte de producción de los PFCs fue en el 2002 donde se determinó que los volúmenes de producción estaban entre 6-227 toneladas. La producción de PFCs en dicho país 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 los PFCs y esto representa un problema de salud pública (ATSDR, 2015).

1.4 El cerdo como modelo para la investigación biomédica

El incremento de investigaciones fisiológicas y nutricionales que utilizan al cerdo como modelo de estudio son un amplio testimonio del valor que posee para este propósito (Pond y Houpt, 1978). El cerdo posee ventajas sobre otros modelos animales como son: ciclo reproductivo corto, reproducción numerosa, gran producción de semen (~300 mL) en comparación con la del humano (~5 mL), además de que posee un gran parecido morfológico y fisiológico con el humano. Por ejemplo, son similares en características dentales, renales, estructura del ojo y agudeza visual, piel, anatomía y fisiología cardiovascular, digestiva, pudiendo extrapolar los resultados que se obtengan como efecto de su estudio en otros modelos semejantes de animales y al humano mismo. El cerdo es un modelo

adecuado para estudios de toxicología reproductiva ya que se pueden coleccionar sus gametos fácilmente y con la ventaja de que se puedan utilizar para estudios *in vitro* (Pond y Houpt, 1978)

2 Antecedentes

2.1 Estudios *in vivo* e *in vitro*

Uno de los grandes problemas de los PFCs es que se caracterizan por tener un potencial de acumulación alto después de la absorción, uniéndose a proteínas séricas (Hundley *et al.*, 2006) de esta manera, los PFCs pueden distribuirse a varios tejidos y al acumularse pueden ocasionar daño. Existen evidencias acerca de esta acumulación en animales y humanos (Cassone *et al.*, 2012). Por ejemplo, se han encontrado en tejidos de humanos que han sido expuestos a comida, agua y aire contaminados diariamente (Prevedouros *et al.*, 2006). El PFOS puede ser encontrado en leche, hígado, cordón umbilical y en líquido seminal (Lau *et al.*, 2007). Los niveles en sangre de personas ocupacionalmente expuestas a los compuestos perfluorados van de 1.30 a 1.97 µg/mL para PFOS y de 1.5 a 3.9 ng/mL para PFHxS (Alexander y Olsen, 2007, ATSDR, 2015).

Estudios en animales y humanos sugieren que existe una asociación entre los compuestos perfluorados y la alteración de las funciones reproductivas (Giesy y Kannan, 2001); sin embargo, el mecanismo por el cual sucede esta asociación se desconoce. En mujeres, se han visto cambios en el ciclo menstrual (Fei *et al.*, 2009),

así como disminución en la tasa de embarazos logrados (Jacquet *et al.*, 2012). Toft *et al.* (2012), reportaron una disminución de espermatozoides morfológicamente normales, así como, disminución de la cantidad de espermatozoides en eyaculados de hombres ocupacionalmente expuestos (Joensen *et al.*, 2009, Toft *et al.*, 2012). Se ha demostrado que muchos plaguicidas producen alteraciones como retención de la gota citoplasmática del espermatozoide, disminución de la movilidad y viabilidad, así como, alteraciones cromosómicas (Contreras y Bustos-Obregón, 1999, Toft *et al.*, 2012) y alteración en la integridad del ADN en hombres expuestos a PFOS (Joensen *et al.*, 2009). Concentraciones altas de PFOS fueron asociadas negativamente con una variedad de mediciones hormonales, sobre todo con la testosterona (Joensen *et al.*, 2013). Se determinó que la CL₅₀ de PFOS fue de ~30 µM en ovocitos correspondiendo al rango de niveles de exposición laboral; se demostró un efecto adverso del PFOS en la maduración, la viabilidad y la integridad del ADN en ovocitos (Campuzano, 2014, Silvestre, 2014). Por otro lado, en espermatozoides se ha observado que la exposición a agentes tóxicos afecta la movilidad y la capacidad para llevar a cabo la RA, lo que es un indicador de daño reproductivo ya que impide que el espermatozoide fertilice al ovocito (Maravilla-Galván *et al.*, 2009).

2.2 Espermatozoides y EROS

La dinámica de la membrana plasmática de la célula espermática cumple un papel importante en los procesos de maduración, capacitación y RA (Muller *et al.*, 1999) y el aumento de las EROS pueden dañarla (Clarkson y Thompson, 2000). Los espermatozoides, por su gran contenido de ácidos grasos poliinsaturados, son

sensibles a lipoperoxidación, el cual es producida, principalmente por las EROS (Aitken *et al.*, 1997). Cuando el ataque oxidante se intensifica, se produce peroxidación lipídica, que provoca una disminución de la movilidad y viabilidad espermática, así también, afecta la integridad acrosomal (Baumber *et al.*, 2000). Sin embargo, una producción moderada de EROS en el espermatozoide es indispensable para que se lleve a cabo la capacitación, pero un desbalance en su producción puede afectar este proceso esencial para lograr la fertilización (Ball *et al.*, 2001).

3 Justificación

Actualmente, hay cerca de 100,000 productos químicos de uso comercial y se estima que se generan entre 700 y 1000 nuevos compuestos anualmente. Alrededor de 1,500 de estos compuestos tienen un volumen de producción elevado, que supera las 10,000 toneladas por año (Valdés y Muir-Leresche, 1993). De los años 70 al 2002 la producción de PFCs fue de 100,000 toneladas en EUA (Paul *et al.*, 2008). Estas cifras son alarmantes si recordamos que los PFCs son muy persistentes en el ambiente y se bioacumulan en los seres vivos poniendo en riesgo la salud de los organismos expuestos. Estos compuestos contaminan los alimentos que al consumirlos los absorbe el cuerpo por el sistema digestivo, por la piel o por inhalación directa del aire contaminado. Los PFCs se han encontrado presentes en el polvo de los hogares a una concentración de 357 $\mu\text{g/g}$ de polvo debido a que se utilizan abundantemente en la industria textil, eléctrica, automotriz y de la

construcción porque a los materiales a los que se agregan, les confieren resistencia al fuego, así como la propiedad de repeler agua, aceite o colorantes. Las empresas, en países como España y Estados Unidos, han disminuido su producción, por el daño que puedan generar a la salud pero, a pesar de ello, la exposición a los PFCs en estos países sigue siendo alta. En México, no se tiene un control de la producción de los PFCs, ni existe monitoreo que pueda dar información acerca del grado de exposición a estos compuestos, siendo esto un problema grave ya que se sabe que los PFCs afectan, entre otros a la reproducción de los individuos expuestos; además, pueden producir daño genético pudiendo causar infertilidad, malformaciones o abortos espontáneos. Debido a su bioacumulación en los organismos, el tiempo de vida media es de 5 años (Alexander y Olsen, 2007). Esta bioacumulación podría causar un daño oxidante en los espermatozoides afectando la reproducción masculina, interfiriendo en la capacidad del espermatozoide para fertilizar al óvulo.

La información existente acerca del efecto de los PFCs sobre la maduración de gametos es muy escasa, de aquí la necesidad de estudios que permitan evaluar su capacidad de interferir en ella. En este estudio se llevó a cabo la valoración toxicológica de los compuestos perfluorados: PFHxS y el PFOS, sobre los procesos de capacitación y RA *in vitro* de espermatozoides de cerdo. Se evaluó la relación entre estos procesos y los niveles de EROS en presencia de los PFCs.

4 Pregunta de investigación

¿Tienen algún efecto los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS sobre los procesos de capacitación y/o RA, así como en un desequilibrio en la producción de EROS en espermatozoides de cerdo *in vitro*?

5 Hipótesis

Los espermatozoides capacitados que serán expuestos a PFHxS y PFOS presentarán afectaciones a nivel de capacitación, RA y en niveles de EROS.

6 Objetivo general

Determinar el efecto de los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS sobre la capacitación, RA y en los niveles de producción de EROS.

7 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de los PFCs sobre la capacitación y la RA espermática.
- Determinar si hay generación y/o inhibición de EROS en espermatozoides durante su exposición a los PFCs durante la capacitación.

8 Material y Métodos

8.1 Obtención de la muestra

Las muestras de semen fueron obtenidas de cerdos sanos normozoospermicos de varias razas, y valorados de acuerdo con criterios establecidos (Garner y Hafez, 1993). Se obtuvieron las muestras por el método de "la mano enguantada". Se filtraron a través de una gasa para eliminar la fracción gelatinosa y se transportaron al laboratorio a 16°C, en menos de dos horas.

8.2 Evaluación espermática.

En el laboratorio se analizó la calidad de las muestras, se determinó la concentración de espermatozoides, movilidad y número de formas anormales con el fin de utilizar solamente muestras normales de acuerdo con criterios ya establecidos: movilidad mayor al 80%, viabilidad mayor al 90 %, de anomalías morfológicas menos del 10% y una concentración superior a $80 \times 10^6/\text{mL}$ de espermatozoides (Garner y Hafez, 1993).

En cada una de las muestras de semen se determinaron los siguientes indicadores:

Movilidad: se determinó por observación directa al microscopio óptico a 40 X y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles. Se determinó el patrón de movilidad de los espermatozoides de acuerdo a la siguiente clasificación: A= movimiento progresivo lineal rápido, B= movimiento progresivo lento, C= movimiento no progresivo y D= inmóvil (Tash y Bracho, 1999).

Viabilidad y Anormalidades Morfológicas: se determinaron por medio de la técnica de Eosina-Nigrosina de acuerdo con los criterios previamente descritos (Björndahl *et al.*, 2003). Se realizó una dilución con la muestra y el colorante a una proporción de 1:1, se hicieron frotis y se dejaron secar a 37 °C. Se observó al microscopio óptico. Se contaron 200 células y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Se consideró como espermatozoides vivos aquéllos que no presentan tinción, y como espermatozoides muertos los teñidos en color rojo. Con los mismos frotis se determinó el total de espermatozoides con anormalidades morfológicas como cabeza grande, cabeza pequeña, flagelo pequeño, flagelo grande, estructuras dañadas o presencia de gota citoplásmica.

8.3 Cinética de Capacitación

Las muestras se capacitaron en medio de capacitación (TALP-Hepes) evaluando el proceso a diferentes horas para realizar una curva de tiempo contra porcentaje de capacitación y determinar el tiempo adecuado del proceso.

8.4 Preparación de la muestra

Se analizaron dos condiciones: espermatozoides capacitados y espermatozoides reaccionados.

El semen se lavó dos veces con solución salina de fosfatos (PBS), se centrifugó a 600 g por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio TALP-HEPES (Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato) (114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂•6H₂O, 25 mM NaHCO₃, 0.4 mM

NaH₂PO₄•H₂O, 10 mM lactato de sodio, 0.1 mM piruvato de sodio) suplementado con 6 mg/mL BSA fracción V y 1 mM de Piruvato de Sodio, pH de 7.4 (Jiménez *et al.*, 2003).

Capacitación: Se tomaron alícuotas de espermatozoides a una concentración de 5 X 10⁶ cel/mL y se depositaron en una caja de 4 pozos con medio de capacitación TALP-HEPES durante 3, 3.5 y 4 horas a 38°C con 5% de CO₂ y en una atmósfera húmeda. Se evaluó la capacitación a los diferentes tiempos de incubación y se evaluó un control que corresponde a espermatozoides sin capacitar.

Espermatozoides Reaccionados: después del tiempo de capacitación se indujo la RA al adicionar 10 mg/mL de progesterona, se incubó por 20 minutos en las mismas condiciones que la capacitación (Jiménez *et al.*, 2003).

8.5 Evaluación de la capacitación y RA con CTC

Se determinó el número de espermatozoides capacitados y reaccionados mediante la técnica de tinción con clorotetraciclina (CTC). Los patrones de fluorescencia producidos al teñir con CTC están relacionados con los cambios de Ca²⁺ intracelular que suceden en dichos procesos. Es por ello que, con esta técnica, se pueden observar patrones de fluorescencia diferentes, que revelarán si el espermatozoide se encuentra capacitado, reaccionado o ninguno de los dos (DasGupta, 1993).

La CTC se preparó a una concentración de 750 µM en Tris 20 mM; NaCl 130 mM; L-cisteína 5 mM, a pH 7.8. En un portaobjetos se mezclaron 5 µL de muestra con 5 µL de solución CTC, posteriormente se agregaron 50 µL de glutaraldehído 0.2 % en Tris

0.5 M a pH 7.4 para fijar las células. Se colocó un cubreobjetos y se observaron las laminillas en un microscopio de epifluorescencia (400–500 nm de excitación y 470 nm de emisión) con un objetivo 40X. Se observaron 200 células y se clasificaron de acuerdo a los siguientes patrones de fluorescencia: S/C (sin capacitar), C (capacitados) y AR (acrosoma reaccionado).

- Patrón S/C: fluorescencia uniforme en la cabeza, acrosoma y flagelo intactos, característica de espermatozoides sin capacitar.
- Patrón C: fluorescencia en la región acrosomal y una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal. Característica de que el espermatozoide está capacitado con acrosoma intacto.
- Patrón AR: no presenta suficiente fluorescencia en la cabeza, excepto una banda delgada fluorescente en la región ecuatorial.

8.6 Determinación de la Concentración Letal media (CL₅₀)

Se incubaron los espermatozoides en presencia de los compuestos PFCs en concentraciones crecientes del PFCs; esto, para determinar la CL₅₀, es decir, la concentración a la cual la mitad de la población de espermatozoides muere en presencia de los tóxicos. Para determinar la CL₅₀ se tomaron las condiciones: control (sin PFCs) y concentraciones de 1000, 2000 y 3000 µM para PFOS y 1000, 2500 y 5000 µM para PFHxS. También se determinó el daño al proceso de capacitación y de la RA, mediante el análisis de los patrones de fluorescencia ya descritos. Se analizaron los patrones de movilidad como se indicó anteriormente. Se comparó la movilidad de los espermatozoides que fueron expuestos a PFCs con el control (sin

tóxico). Una vez que se identificó la CL_{50} los espermatozoides se incubaron durante el periodo de capacitación con concentraciones de PFCs de $1/5 CL_{50}$, $1/2 CL_{50}$ y la CL_{50} y se encontró la concentración de inhibición del proceso de la capacitación y de la RA.

8.7 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROS)

Para la evaluación de las EROS se utilizaron las concentraciones 92, 230 y 460 μM de PFOS y 1000, 2500 y 5000 μM de PFHxS. Se utilizó como indicador una sonda fluorogénica permeable a las células 2',7'-Dichlorodihidrofluorescein diacetato (DCFH-DA), la que difunde dentro de las células y ahí se desacetila por esterasas celulares para formar el DCFH, que no es fluorescente pero que se oxida rápidamente a 2',7'-Dichlorodihidrofluoresceina (DCF) en presencia de EROS; este último es muy fluorescente, y la intensidad de fluorescencia es proporcional a los niveles de EROS intracelular.

Después de la capacitación, la suspensión de espermatozoides (5×10^6 cel/mL), en todas las condiciones: control, tratamiento con PFCs a $1/5 CL_{50}$ y $1/2 CL_{50}$ y CL_{50} , se lavaron dos veces con PBS por centrifugación durante 5 min a 600Xg, el botón celular se resuspendió en PBS y se incubó con DCFH-DA a una concentración de 10 μM durante 15 min a 37 °C (Hikita *et al.*, 2015). Después se lavaron con PBS, las células teñidas se colocaron en un portaobjetos para ser analizadas en un microscopio de epifluorescencia.

8.8 Análisis estadístico

Para calcular la **concentración letal media** (CL_{50}) y la **concentración de inhibición media** (CI_{50}) de los procesos de capacitación y RA se utilizó el análisis de regresión lineal binomial Probit, que mide la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que presentan una respuesta al estímulo. Los resultados se analizaron mediante la prueba estadística de comparación múltiple ANOVA, seguida de la prueba post-hoc de TUKEY para determinar entre que grupos existían diferencias significativas. Se utilizó al menos una $N=5$ y se consideró una $P<0.05$ para establecer significancia.

9 Resultados

9.1 Patrones de capacitación (CTC)

Se realizó la capacitación *in vitro*, para su evaluación se identificaron los patrones de fluorescencia con CTC (figura 1).

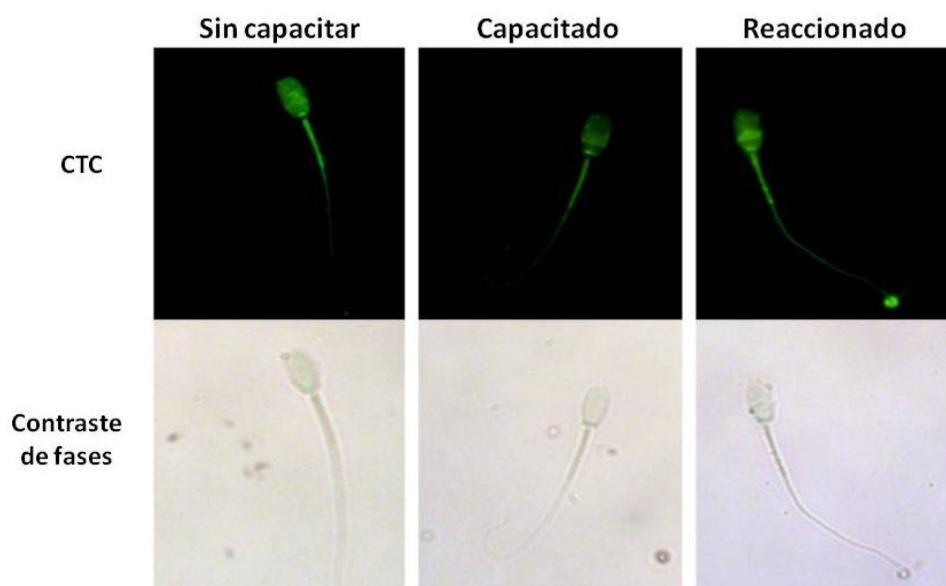


Figura 1. Patrones de tinción con CTC. Se muestran los patrones observados para identificar un espermatozoide sin capacitar, capacitado y con RA. La fluorescencia de un espermatozoide sin capacitar: tinción homogénea en toda la cabeza; espermatozoide capacitado: la fluorescencia se concentra en la zona acrosomal con una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal; espermatozoide reaccionado: se concentra la fluorescencia en la región ecuatorial. 40X.

9.2 Cinética de capacitación

Se realizó una cinética durante la incubación de los espermatozoides, para determinar el tiempo adecuado de la capacitación. Los espermatozoides cosecharon a 0, 3, 3.5 y 4h, posteriormente, se indujo la RA durante media hora más. Se cuantificaron los espermatozoides sin capacitar, capacitados y reaccionados. Al tiempo 0, la capacitación espermática basal fue de 7.5%, se incrementó conforme

pasó el tiempo de incubación, llegando al máximo a las 4 horas (71.5%). Al inducir la RA con progesterona se observó que 21.5% de espermatozoides hicieron la RA después de la incubación de 4 h. Con estos resultados se comprobó que el tiempo óptimo de capacitación es a las 4h como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Cinética de capacitación y RA en espermatozoides de cerdo *in vitro*.

(%)	Capacitación de espermatozoides				
	Tiempo de incubación (horas)				
	0	3	3.5	4	4:20*
Sin capacitar	85.25±1.76	62.5±14.84	50.5±10.6	26.5±0.70	14±10.6
Capacitados	7.5±2.12	36±15.55	46±11.31	71.5±0.70	64.5±17.67
Reaccionado	7.25±0.35	1.5±0.70	3.5±0.70	2±0	21.5±7.07
Total	100	100	100	100	100

N= 5 por duplicado. El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una P<0.05 indicó una diferencia significativa entre cada uno de los grupos se muestra la media de espermatozoides sin capacitar, capacitados y reaccionados observados con la tinción de CTC ± DS. *RA inducida

9.3 Toxicidad de PFOS en los espermatozoides de cerdo *in vitro*.

Para determinar la toxicidad producida por el PFOS en los espermatozoides se evaluó su viabilidad, movilidad, capacitación y RA de los espermatozoides incubados en presencia del perfluorado.

9.3.1 Concentración letal media (CL₅₀) de PFOS

Se realizaron 6 experimentos por duplicado. Se preparó un stock de 200 mM de PFOS diluido en dimetil sulfóxido (DMSO), se evaluaron tres concentraciones: 1000, 2000 y 3000 μM de PFOS finales en medio de capacitación.

Se evaluó la viabilidad espermática correspondiente a las concentraciones probadas. Los resultados mostraron que el DMSO (0.75%) no causa daño citotóxico, se encontró 63.43% de viabilidad y no hubo diferencias significativas con respecto al control, 61.69%. En presencia del tóxico, se observó una disminución de las células vivas conforme aumenta la concentración de PFOS, 36.44% para 1000 μM , 14.53% para 2000 μM y 2.92% para 3000 μM de PFOS con diferencia significativa entre cada uno de los grupos (Tabla 2 y Figura 2). Esto indica que el PFOS tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de los espermatozoides. La CL₅₀ de PFOS fue de 460.55 μM como se muestra en la tabla 3.

Tabla 2. Efecto de PFOS sobre la viabilidad de espermatozoides de cerdo *in vitro*. La viabilidad disminuye conforme aumenta la concentración de PFOS.

Viabilidad (%)	PFOS [μ M]				
	0 Control	0/DMSO control	1000	2000	3000
	61.69 \pm 0.86	63.43 \pm 2.74	36.44 \pm 1.54	14.53 \pm 3.87	2.92 \pm 1.11

N= 6, cada uno por duplicado. El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ indicó una diferencia significativa entre cada uno de los grupos, excepto entre el control con control DMSO. Se muestran la media y desviación estándar de la viabilidad de los espermatozoides.

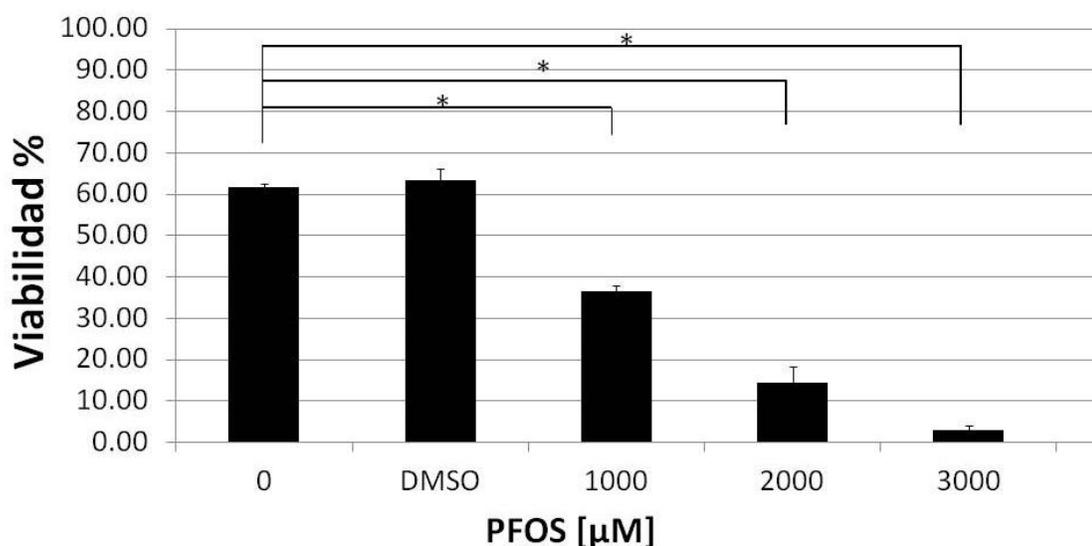


Fig. 2 Efecto de PFOS sobre la viabilidad de espermatozoides de cerdo *in vitro*. Hay un comportamiento inversamente proporcional a la concentración de PFOS. N=6 por duplicado. El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ muestra diferencia significativa entre cada uno de los grupos, excepto entre el control y control DMSO. Se grafica media y desviación estándar de la viabilidad.

Tabla 3. Análisis Probit para determinar CL₅₀ de PFOS. Con el análisis Probit se determinó la CL₅₀= 460.55 µM. N=6 por duplicado.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para VAR00001		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.250	-492.043	-664.638	-343.066
.300	-280.068	-435.710	-144.865
.350	-83.642	-224.277	39.501
.400	102.747	-24.486	215.285
.450	283.080	167.776	386.395
.500	460.555	355.678	556.105
.550	638.029	541.891	727.503
.600	818.363	728.931	903.836
.650	1004.752	919.512	1088.829
.700	1201.178	1117.049	1287.090
.750	1413.152	1326.477	1504.792

9.3.2 Efecto de PFOS sobre la movilidad espermática

En la tabla cuatro se muestran los resultados de la movilidad espermática en presencia de PFOS. En el control se observó la condición A= movilidad progresiva lineal rápida que disminuyó de manera gradual con el aumento de la concentración de PFOS. En la concentración de PFOS más alta (3000 µM), no se observó movilidad progresiva lineal rápida, únicamente se observó movimiento no progresivo (D) y hubo un aumento drástico de la aglutinación en un 100% del campo observado (tabla 4). En la figura 3, se muestran los patrones de aglutinación de espermatozoides, se observó un incremento en el número y tamaño de los aglutinados al aumentar la concentración de PFOS. Estos aglutinados presentan

movimiento únicamente vibrátil, correspondiente a la condición C e inmóviles D en la concentración 3000 μ M.

Tabla 4. Efecto de PFOS sobre la movilidad de espermatozoides de cerdo *in vitro*.

Movilidad:	PFOS [μ M]				
	0 Control	0/DMSO Control	1000	2000	3000
A	XXX	XXX	XX	X	X
B	X	X	X	X	X
C	X	X	X	XX	XXX
D	X	X	X	XX	XX

Patrones de movimiento: A=Progresivo lineal rápido, B=Progresivo lento, C=No progresivo y D= inmóvil. Disminuye la movilidad progresiva A, aumenta la condición C= movimiento progresivo lento que corresponde a los espermatozoides formando aglutinados. Aumentan los espermatozoides inmóviles en relación con el aumento de la concentración de PFOS. XXX=patrón muy dominante, XX=patrón medio dominante y X=patrón poco dominante.

μM PFOS

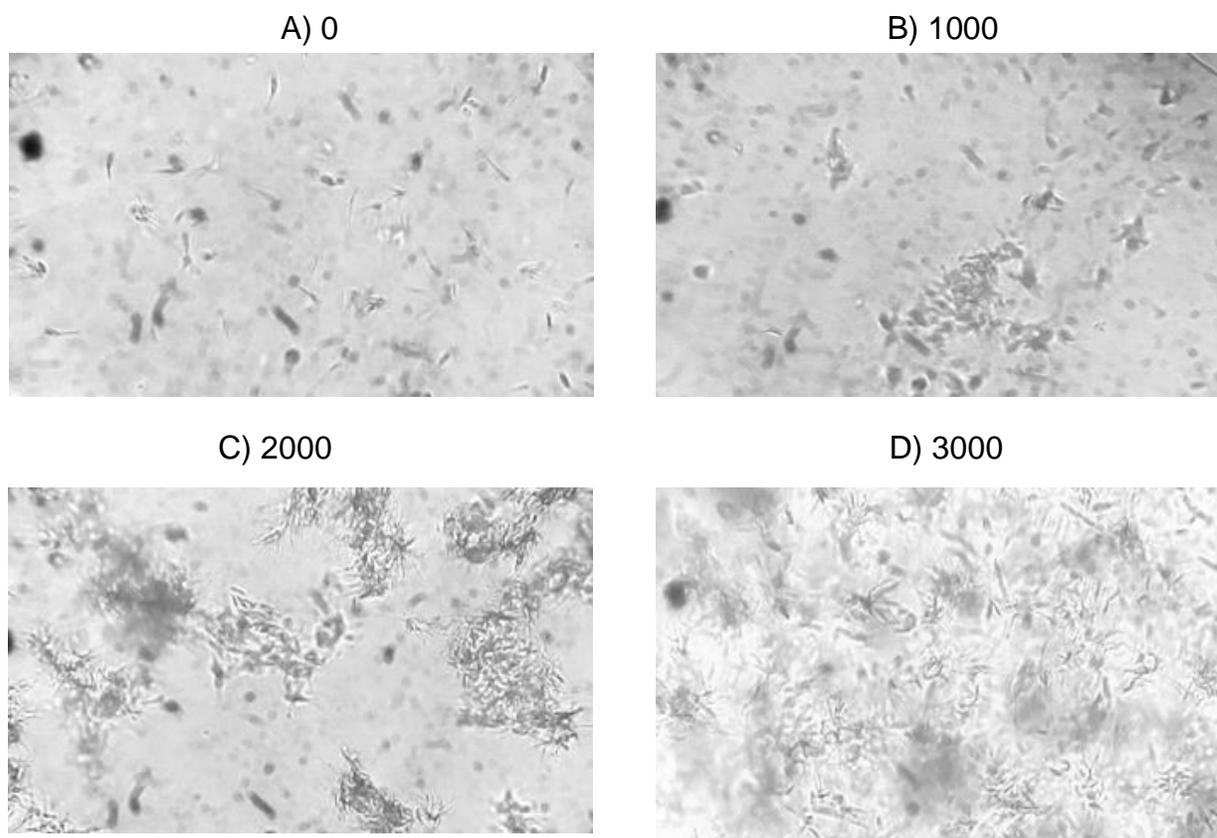


Figura 3. Microfotografía 40X de aglutinaciones de espermatozoides formados en presencia de PFOS. Se observó que conforme aumenta la concentración del tóxico, se incrementa el número y tamaño de las aglutinaciones. El movimiento de los espermatozoides corresponde al patrón C de movimiento no progresivo (100% de aglutinaciones en campo observado de 3000 μM).

9.3.3 Efecto de PFOS sobre la capacitación

En los espermatozoides que fueron expuestos a PFOS se observó una disminución en la capacitación. En el grupo control se encontró capacitación de 60.86% y, conforme se incrementó la concentración del tóxico la capacitación disminuyó, en 1000 μM a 26.81%, en 2000 μM a 20.51% y en 3000 μM a 9.54% mostrando

diferencias significativas entre cada uno de los grupos, excepto entre 1000 μM con 2000 μM y tampoco entre los dos grupos control, como era de esperarse (tabla 5). Con estos resultados se puede afirmar que el proceso de la capacitación se ve afectado cuando los espermatozoides son expuestos a PFOS ya que disminuye significativamente desde la concentración de 1000 μM (26.81%).

Tabla 5. Efecto de PFOS sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo *in vitro*. Disminuye la capacitación de espermatozoides en respuesta a un aumento de PFOS.

(%)	PFOS [μM]				
	0 Control	0/DMSO Control	1000	2000	3000
Sin capacitar	37.20 \pm 2.28	38.78 \pm 1.76	71.05 \pm 1.83	77.71 \pm 1.97	89.76 \pm 2.84
Capacitados	60.86 \pm 1.67	60.63 \pm 2.33	26.81 \pm 2.05	20.51 \pm 1.54	9.54 \pm 2.18
Reaccionados	1.94 \pm 1.18	2.14 \pm 1.34	1.78 \pm 0.84	0.69 \pm 0.83	0.59 \pm 0.64
Total	100	100	100	100	100

N= 6 por duplicado. El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ indicaron diferencias significativas entre cada uno de los grupos de espermatozoides capacitados, excepto entre 1000 μM con 2000 μM y entre el control con el control DMSO. Se muestran la media y desviación estándar de espermatozoides sin capacitar, capacitados y espermatozoides con RA espontánea.

9.3.4 Efecto 1/5 CL_{50} , 1/2 CL_{50} y CL_{50} de PFOS sobre la capacitación

Una vez que se obtuvo la $\text{CL}_{50} = 460.55 \mu\text{M}$ de PFOS, se capacitaron los espermatozoides expuestos a 1/5 CL_{50} , 1/2 CL_{50} y a CL_{50} que corresponden a 92,

230 y 460 μM respectivamente. Esto con el objetivo de determinar la Cl_{50} que es la concentración de inhibición media, es decir, la concentración a la cual PFOS inhibe al 50% el proceso de la capacitación (tabla 6).

Tabla 6. Efecto de $1/5\text{CL}_{50}$, $1/2\text{CL}_{50}$ y CL_{50} de PFOS sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo *in vitro*. Disminuye la capacitación conforme aumenta la concentración de PFOS.

(%)	PFOS [μM]				
	0 Control	0/DMSO Control	92	230	460
Sin capacitar	21.04 \pm 6.31	20.47 \pm 7.32	53.04 \pm 3.29	62.96 \pm 4.25	69.67 \pm 1.61
Capacitados	77.48\pm5.72	78.68\pm7.67	46.11\pm3.51	36.56\pm4.41	30.18\pm1.85
Reaccionados	1.48 \pm 1.11	0.85 \pm 0.73	0.85 \pm 0.69	0.47 \pm 0.50	0.16 \pm 0.33
Total	100	100	100	100	100

N= 6 por duplicado El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ indicaron que hay diferencias significativas entre el grupo control y los experimentales, pero no lo hubo entre 92, 230 y 460 μM . No hay diferencias significativas entre los espermatozoides con RA espontánea. Se muestran la media y desviación estándar de espermatozoides sin capacitar, capacitados y espermatozoides con RA espontánea.

Bajo estas condiciones, la capacitación fue de 77.5% para el control hasta 46% en 92 μM y a 30% en 460 μM . Hay diferencias significativas entre la concentración 92 μM y el control, pero no se muestran diferencias significativas entre las concentraciones 92, 230 y 460 μM manteniéndose el mismo grado de capacitación en las tres

concentraciones como se observa en la tabla 6. El PFOS altera el proceso de capacitación desde una concentración mínima de 92 μM .

Los resultados de la inducción de la RA se encuentran en la tabla 7. El grupo control alcanzó una RA de 27% siendo este el valor esperado en cerdo (Jiménez *et al.*, 2003). A 92 μM de PFOS, la capacitación disminuyó casi a la mitad (15.3%), es decir, basta con esta concentración para que exista un efecto significativo de PFOS sobre la RA de espermatozoides de cerdo *in vitro*. Sin embargo a la concentración de 230 μM (3.1%) y 460 μM (3.4%) se observa un bloqueo de la RA. Cabe mencionar que también disminuyen los porcentajes de capacitación en cada uno de los grupos por efecto de PFOS y, además porque una parte de los espermatozoides hicieron RA.

Tabla 7. Efecto de $1/5\text{CL}_{50}$, $1/2\text{CL}_{50}$ y CL_{50} de PFOS sobre la RA de espermatozoides de cerdo *in vitro*. La RA decayó casi a la mitad desde la concentración de 92 μM de PFOS.

(%)	PFOS [μM] con RA inducida				
	0 Control	0/DMSO Control	92	230	460
Sin capacitar	17.91 \pm 4.55	42.50 \pm 4.23	46.75 \pm 3.60	60.57 \pm 3.46	70.12 \pm 2.70
Capacitados	54.96 \pm 1.56	53.93 \pm 4.39	37.97 \pm 2.84	30.26 \pm 4.19	26.40 \pm 2.97
Reaccionados	27.12 \pm 3.53	26.96 \pm 5.51	15.26 \pm 3.74	3.15 \pm 0.44	3.39 \pm 1.56
Total	100	100	100	100	100

N= 6 por duplicado El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ mostraron que hay diferencias significativas entre los grupo control y los experimentales, pero no lo hubo entre 230 con 460 μM . Se muestran la media y desviación estándar de espermatozoides sin capacitar, capacitados y espermatozoides con inducción de RA.

9.3.5 Concentración de PFOS de inhibición media de la capacitación (CI_{50})

Con los resultados obtenidos (tabla 6) se determinó la concentración de inhibición media (CI_{50}) de la capacitación de espermatozoides de cerdo *in vitro* por medio del análisis Probit. La CI_{50} que resultó fue de 274 μM (tabla 8), que corresponde a la concentración de PFOS que inhibió el 50% del proceso de capacitación.

Tabla 8. Análisis PROBIT para determinar CI_{50} de la capacitación de PFOS.

Límites de confianza			
Probabilidad	Límites de confianza al 95% para VAR00001		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.250	1592.577	1426.450	1776.167
.300	1299.134	1134.842	1466.465
.350	1027.216	853.206	1190.897
.400	769.192	576.259	939.113
.450	519.551	300.984	702.835
.500	273.868	24.860	475.516
.550	28.185	-254.939	251.871
.600	-221.456	-541.892	27.270
.650	-479.480	-840.456	-202.897
.700	-751.398	-1156.641	-443.915
.750	-1044.841	-1499.122	-702.744

$CI_{50}=273.868 \mu\text{M}$. N=6 por duplicado.

9.3.6 Concentración de PFOS de inhibición media (CI₅₀) de la RA

Se determinó la CI₅₀ de la RA a partir de los resultados de la tabla 7 con el análisis Probit. La CI₅₀ que resultó fue de 110.2 μM, que es la concentración con la que se inhibió el proceso de RA en un 50% (figura 4).

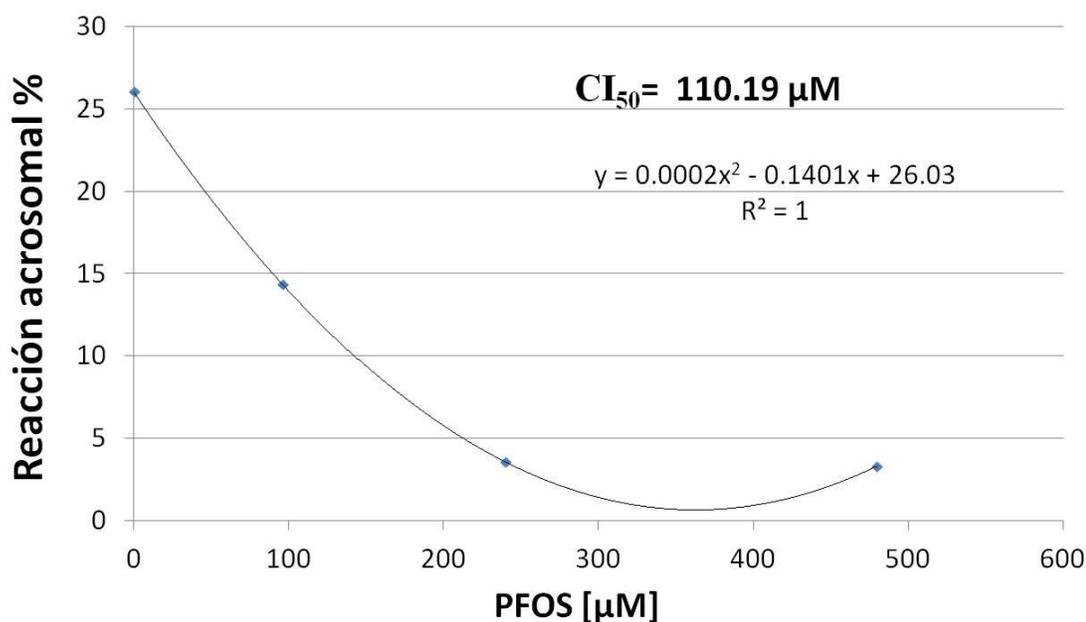


Figura 4. Reacción acrosomal vs concentración de PFOS. Por el análisis Probit se determinó la CI₅₀= 110.19 μM. Se disminuye la reacción acrosomal de manera inversa al aumento de la concentración de PFOS. N=6 por duplicado.

9.3.7 Efecto de 1/5CL₅₀, 1/2CL₅₀ y CL₅₀ de PFOS sobre la movilidad espermática

El control presentó movimiento progresivo lineal rápido (patrón A), a de 230 μM de PFOS, disminuyó considerablemente el movimiento y en 460 μM la movilidad progresiva lineal rápida fue imperceptible y predominó el movimiento D= no

progresivo, debido a un aumento en la aglutinación, aproximadamente en un 40% del campo observado (tabla 9). En la figura 5, se observa un aumento en la formación de aglutinados conforme aumenta la concentración de PFOS, el tamaño de los aglutinados aumenta y los espermatozoides presentan un movimiento vibratorio correspondiente a la condición C. Estos resultados indican que PFOS disminuye la movilidad de los espermatozoides y aumenta la cantidad de aglutinaciones de manera no tan drástica como en las concentraciones antes usadas de 2000 μM y 3000 μM de PFOS.

Tabla 9. Efecto de PFOS sobre la movilidad de espermatozoides de cerdo *in vitro*.

Movilidad:	PFOS [μM]				
	0 Control	0/DMSO Control	92	230	460
A	XXX	XXX	XXX	XX	X
B	X	X	X	XX	X
C	X	X	X	XX	XX
D	X	X	X	XX	XX

Patrones de movimiento: A=Progresivo lineal rápido, B=Progresivo lento, C=No progresivo y D= inmóvil. Disminuye la movilidad progresiva A en la concentración de 230 μM y 460 μM de PFOS, se incrementa el movimiento C= movimiento progresivo lento que corresponde a los espermatozoides formando aglutinados. Aumentan los espermatozoides inmóviles de manera dependiente al aumento a la concentración de PFOS.

PFOS [μM]

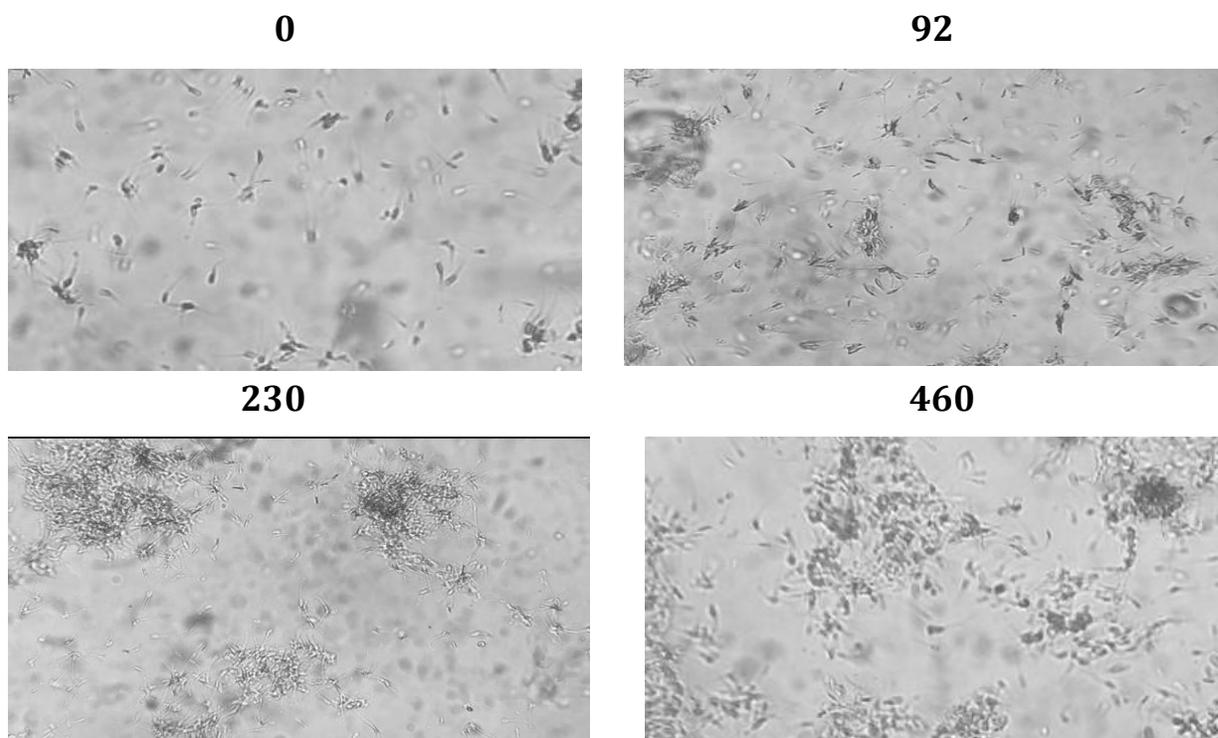


Figura 5. Microfotografía 40X de aglutinaciones de espermatozoides formados con PFOS. Conforme aumenta la concentración de PFOS aumentan las aglutinaciones correspondiendo a la condición C de movimiento no progresivo (40% de aglutinaciones del campo observado en 460 μM).

9.3.8 Efecto de $1/5\text{CL}_{50}$, $1/2\text{CL}_{50}$ y CL_{50} de PFOS sobre la viabilidad espermática

Se determinó la viabilidad de cada una de las fracciones de PFOS después de la capacitación y la RA. La viabilidad se comportó de manera similar a los ensayos anteriores en los cuales se observó que disminuye la viabilidad conforme aumenta la concentración de PFOS. En la menor concentración (92 μM) de PFOS la viabilidad fue de 60.86%, para 230 μM la viabilidad bajó a 51.99% y en 460 μM fue de 40.65%. Se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos con respecto al

control, excepto entre los grupos control. Con respecto a la RA, la viabilidad se mantiene similar a la capacitación para 92 μM de PFOS fue de 64.69%, para 230 μM la viabilidad bajó a 53.03%; sin embargo, en 460 μM de PFOS se observó una disminución drástica (26.5%). Hay diferencias significativas entre cada uno de los grupos, excepto entre 92 y 230 μM , así como, entre los grupos control (tabla 10 y 11).

Tabla 10. Efecto de $1/5\text{CL}_{50}$, $1/2\text{CL}_{50}$ y CL_{50} de PFOS sobre la viabilidad de espermatozoides de cerdo capacitados *in vitro* (%). La viabilidad disminuye en relación a un aumento de concentración de PFOS.

	PFOS [μM]				
	0 Control	0/DMSO control	96	230	460
Viabilidad (%)	72.91 \pm 6.21	73.83 \pm 3.21	60.86 \pm 6.72	51.99 \pm 4.56	40.65 \pm 8.13

N= 6 por duplicado. El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ indicaron una diferencia significativa entre cada uno de los grupos, excepto entre el control con control DMSO y con 96 μM . Se muestran la media y desviación estándar de la viabilidad de los espermatozoides.

Tabla 11. Efecto de 1/5CL₅₀, 1/2CL₅₀ y CL₅₀ PFOS sobre la viabilidad de espermatozoides con inducción de RA de cerdo *in vitro* (%). La viabilidad disminuye en relación a un aumento de concentración de PFOS.

	PFOS [μ M] con RA inducida				
	0 Control	0/DMSO control	92	230	460
Viabilidad (%)	75.06 \pm 6.22	73.5 \pm 7.07	64.69 \pm 3.49	53.03 \pm 5.61	26.5 \pm 0.70

N= 6 por duplicado. El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una P<0.05 indicaron diferencia significativa entre cada uno de los grupos, excepto entre el control con control DMSO y entre 96 μ M con 240 μ M. Se muestran la media y desviación estándar de la viabilidad de los espermatozoides.

9.4 Toxicidad de PFHxS en los espermatozoides de cerdo *in vitro*.

Se realizaron 6 experimentos por duplicado sobre el efecto que tiene PFHxS en la capacitación, RA y viabilidad de los espermatozoides de cerdo *in vitro*. Para ello se capacitaron los espermatozoides durante 4 horas de incubación con las siguientes concentraciones del tóxico: 0, 250, 500 y 1000 μ M. Se incluyó el control DMSO para determinar su citotoxicidad. Los resultados no muestran diferencias significativas entre el control y las concentraciones por lo que procedió a agregar dos concentraciones más altas 2500 y 5000 μ M.

9.4.1 Efecto de PFHxS sobre la viabilidad espermática

La viabilidad se mantuvo constante en los primeros 5 grupos observables, pero encuentra su umbral en 2500 y continúa disminuyendo en 5000 μ M como se muestra en la figura 6.

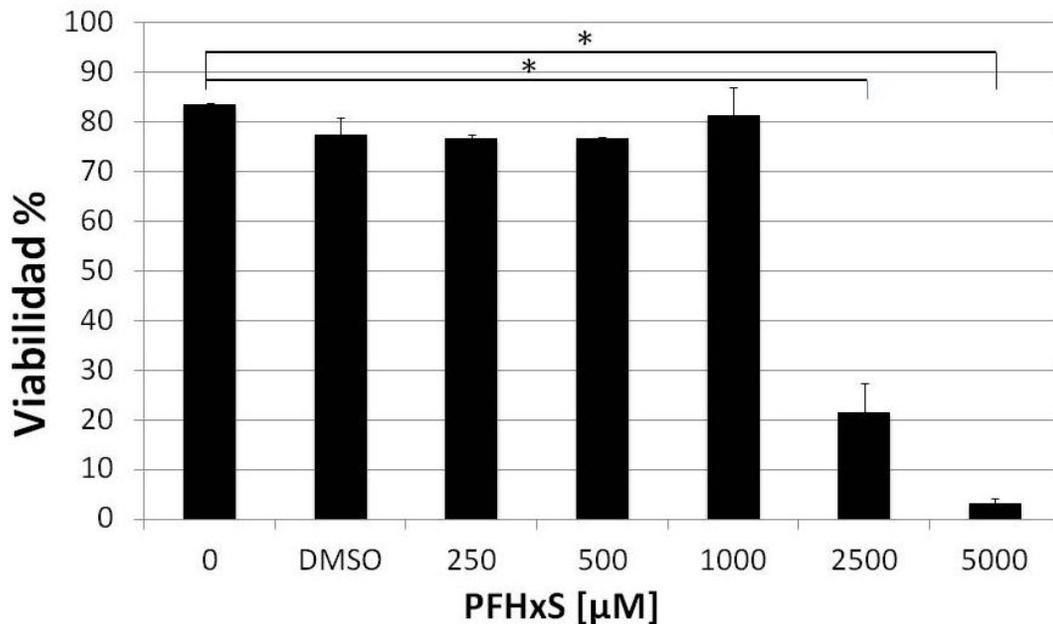


Figura 6. Efecto de PFHxS sobre la viabilidad de espermatozoides de cerdo *in vitro*. La viabilidad permanece intacta conforme se aumenta la concentración de PFHxS hasta 1000 µM pero disminuye en 2500 µM y en 5000 µM. N=6, por duplicado. El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ muestran que no hay diferencias significativas entre cada uno de los grupos, excepto entre 2500 µM y en 5000 µM con los demás grupos. Se grafica media y desviación estándar de la viabilidad.

Los datos obtenidos han revelado que no existe una alteración en la viabilidad de los espermatozoides al ser tratados con 250, 500 y 1000 µM de PFHxS pero si a concentraciones tan altas como 2500 y 5000 µM. Por lo que se puede concluir que no hay efecto de PFHxS sobre la viabilidad espermática a concentraciones menores a 1000 µM. Con el análisis PROBIT se determinó que la CL_{50} fue de 1922.157 µM (tabla 12).

Tabla 12. Análisis Probit para determinar CL₅₀ de PFHxS.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para VAR00001		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.250	1019.090	748.594	1252.440
.300	1220.043	968.741	1446.385
.350	1406.255	1168.488	1630.355
.400	1582.953	1353.842	1809.111
.450	1753.910	1529.121	1986.113
.500	1922.157	1697.770	2164.160
.550	2090.403	1862.822	2345.804
.600	2261.360	2027.212	2533.695
.650	2438.058	2194.071	2730.946
.700	2624.271	2367.098	2941.637
.750	2825.224	2551.174	3171.652

CL₅₀=1922.157 µM. N=6 por duplicado

9.4.2 Efecto de PFHxS sobre la capacitación y RA

Se cuantificó el porcentaje de espermatozoides sin capacitar, capacitados y reaccionados después de las 4 horas de incubación por la técnica de tinción con CTC, se contaron 200 células (figura 7). El proceso de capacitación se mantuvo constante en las cuatro concentraciones de PFHxS (80 % de capacitación), por lo que no hubo algún efecto de PFHxS sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo *in vitro*.

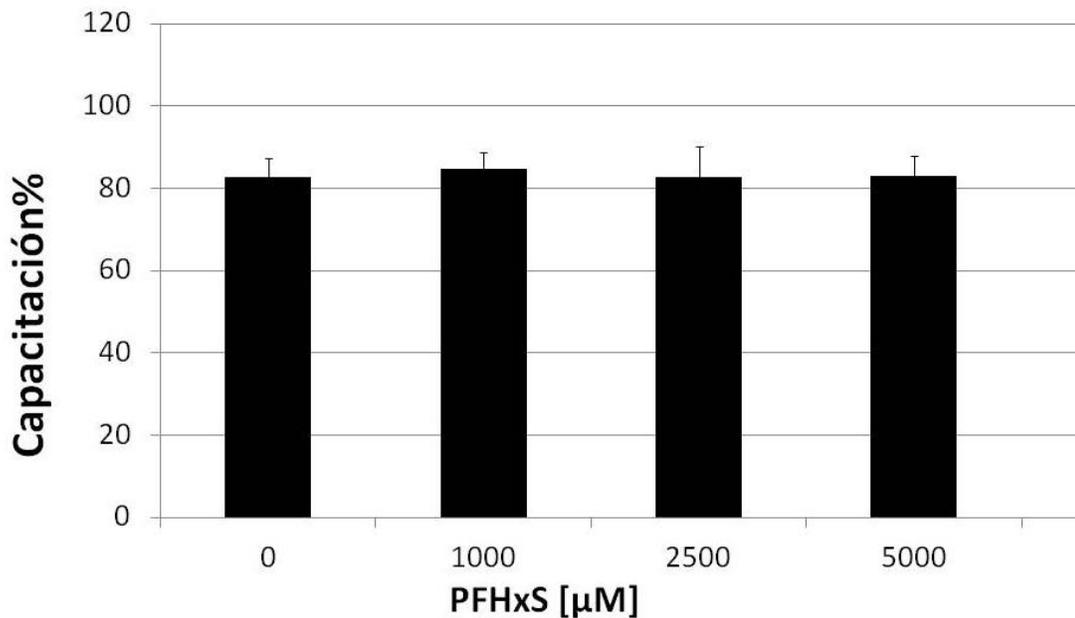


Figura 7. Efecto de PFHxS sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo *in vitro* (%). El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ muestran que no hay diferencias significativas entre cada uno de los grupos. Se muestran la media y la desviación estándar de espermatozoides capacitados.

En cuanto al proceso de la RA, no hubo cambios significativos ante la exposición de PFHxS a las diferentes concentraciones, en 1000 µM (25.8%) y 2500 µM (24.9%) con respecto al control 0 µM (29.4%), pero si con 5000 µM (10.4%) debido a que ésta es una concentración muy alta (figura 8).

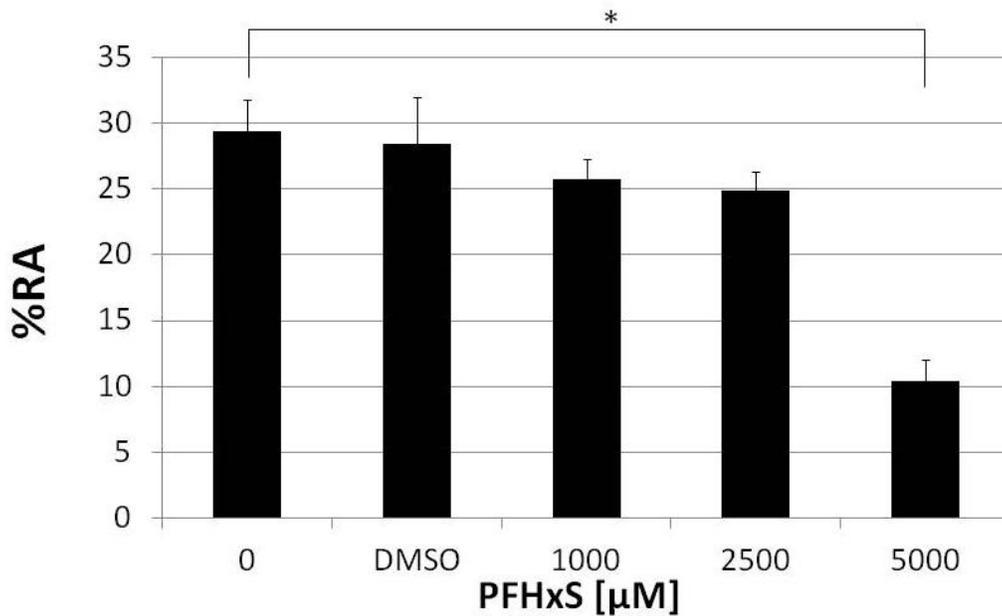


Figura 8. Efecto de PFHxS sobre la RA de espermatozoides de cerdo *in vitro*. La RA no cambia conforme el aumento de la concentración de PFHxS, hasta 5000 μM . N=6 por duplicado. El análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$ muestran que no hay diferencias significativas entre cada uno de los grupos, excepto entre 5000 μM con los demás grupos. Se muestran la media y la desviación estándar de espermatozoides capacitados.

9.4.3 Efecto de PFHxS sobre la movilidad y aglutinación espermática

Se evaluó la movilidad con las condiciones ya establecidas con anterioridad, así como la formación de aglutinaciones en cada concentración, por medio de observación directa en un microscopio invertido a 40X (tabla 12).

La movilidad espermática se mantuvo igual en todas las condiciones, con o sin el perfluorado, lo que indica que PFHxS no tiene efecto en la movilidad espermática durante la capacitación, así como en la formación de aglutinados extras a los

observados normalmente como un indicativo de una buena capacitación, por lo que PFHxS no tiene efecto alguno en la formación de aglutinados.

10. Efecto de PFCs sobre la producción de EROS

Para estandarizar la técnica de detección de EROS por medio de microscopía de fluorescencia se utilizaron tres distintas concentraciones del indicador fluorescente DCFH-DA, 1, 5 y 10 μM . Se determinó que 10 μM fue la mejor concentración para evaluar fluorescencia y PBS como medio de incubación. Para medir la fluorescencia se utilizó el programa ZEN lite de ZEISS. Se realizaron 5 experimentos independientes por duplicado.

La fluorescencia se midió en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) que es proporcional a la producción de EROS. La fluorescencia es menor en espermatozoides sin capacitar (14.9 UA), en comparación con el control positivo en presencia de H_2O_2 (79.06 UA). Al comparar los espermatozoides sin capacitar con los espermatozoides capacitados 0 μM de PFOS (71.23 UA) se observó un aumento de EROS estadísticamente significativo en los capacitados. Al comparar el control con los espermatozoides tratados con PFOS, no se observó diferencia significativa con la concentración de 92 μM (1/5 CL_{50}) de PFOS (62.20 UA). Sin embargo, se observaron diferencias significativas con las concentraciones 230 μM (1/2 CL_{50}) (52.20 UA) y con 460 μM CL_{50} (49.52 UA) en las que disminuyeron los niveles de EROS (figura 9 y 10).

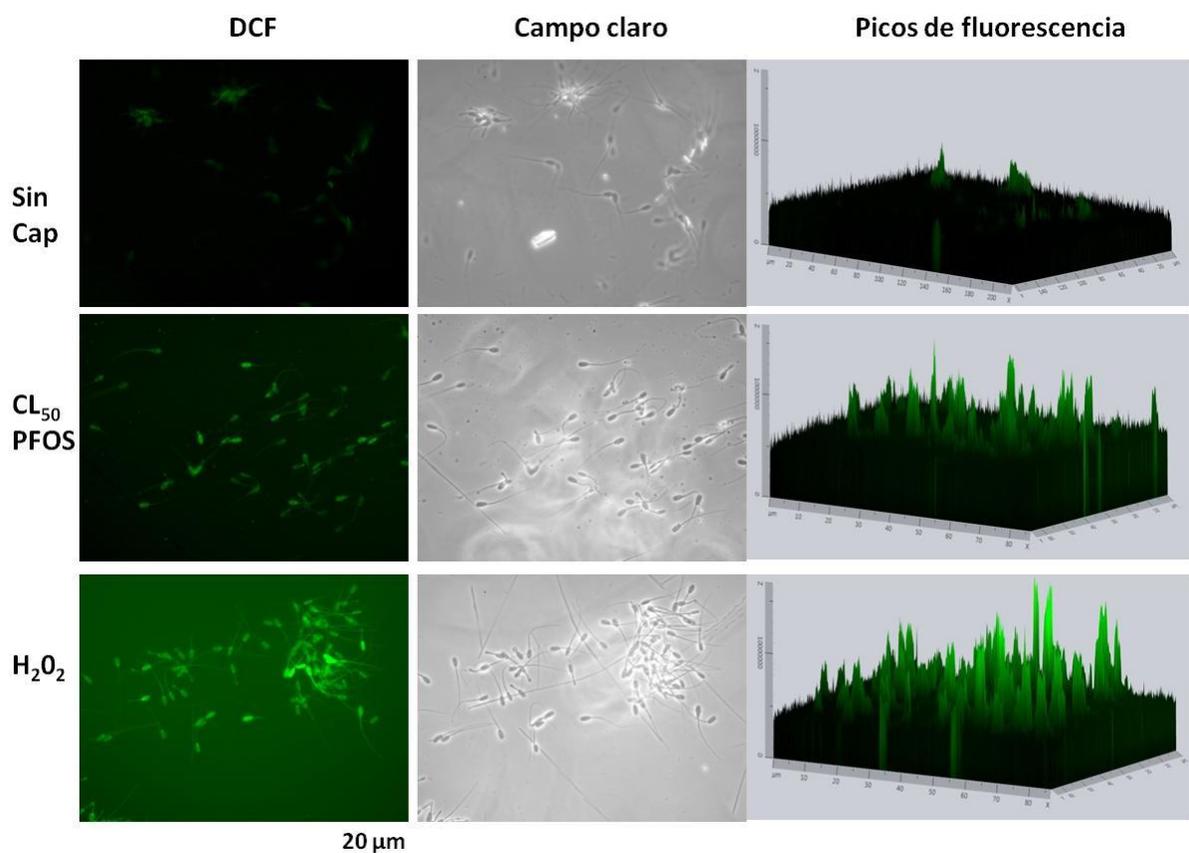


Figura 9. Fluorescencia de DCF equivalente a niveles de EROS en espermatozoides sin capacitar, con CL₅₀ de PFOS y control H₂O₂. Los picos de fluorescencia aumentan en CL50 en comparación con la fluorescencia de espermatozoides sin capacitar. N=5 por duplicado.

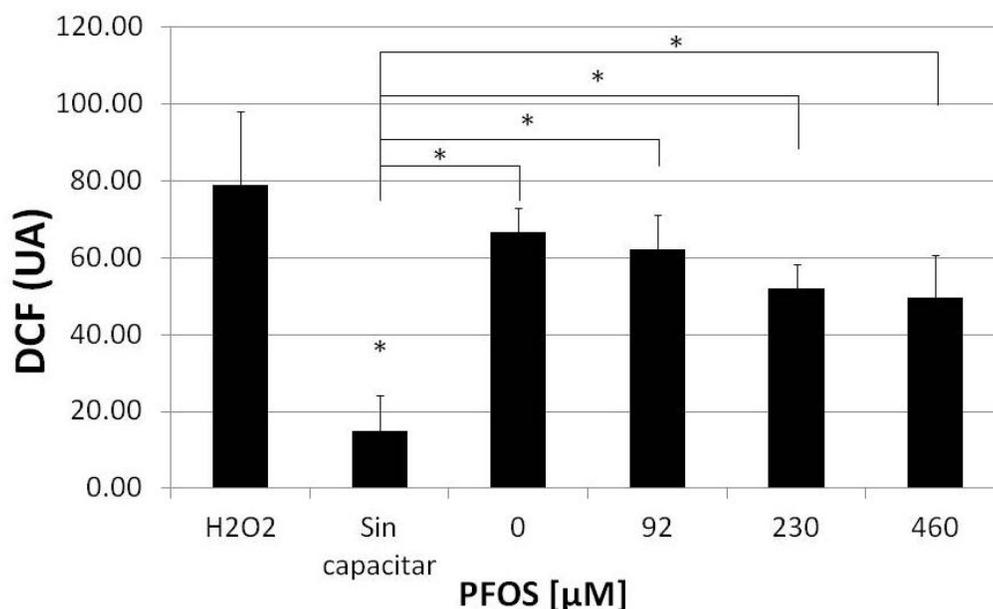


Figura 10. Efecto de PFOS sobre los niveles de EROS de espermatozoides de cerdo *in vitro* (UA=Unidades Arbitrarias de fluorescencia de DCF). Hay diferencias significativas entre espermatozoides sin capacitar con 0 μM de PFOS y también entre 0 μM con 230 μM y con 460 μM de PFOS (CL_{50}). N=5 por duplicado, se muestran la media y la desviación estándar de cada grupo.

Con respecto a PFHxS, la fluorescencia correspondiente a los niveles de EROS en espermatozoides sin capacitar es menor (18 UA) en comparación con el control H_2O_2 (82 UA). Al comparar los espermatozoides sin capacitar con los espermatozoides capacitados 0 μM de PFHxS (63.15 UA) se observó un aumento de EROS estadísticamente significativo en los capacitados. Nuestros resultados muestran un incremento de EROS después del proceso de capacitación, este comportamiento sugiere que es necesaria la producción de EROS para que el proceso se realice adecuadamente. Por otro lado no se observan diferencias significativas entre el control 0 μM (63.15 UA) y la concentración de 1000 μM de PFHxS (62.20 UA); en las

concentraciones 2500 y 5000 μM hay una tendencia a disminuir, sin embargo, no hay diferencias significativas con los demás grupos (figura 11 y 12).

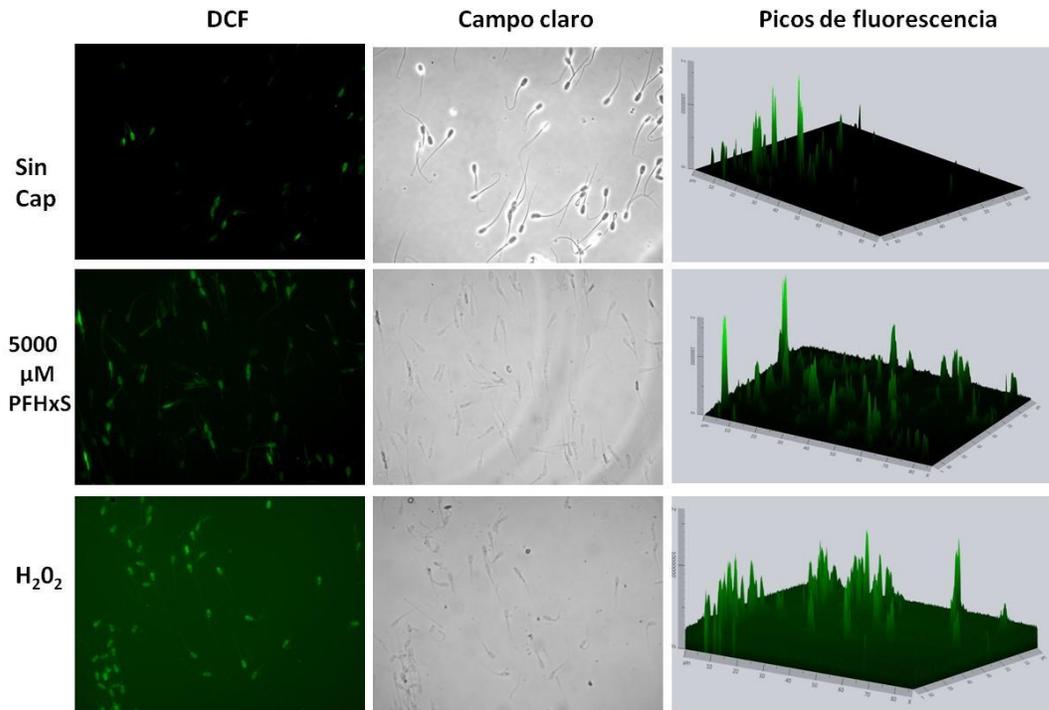


Figura 11. Fluorescencia de DCF equivalente a niveles de EROS en espermatozoides sin capacitar, con 5000 μM de PFOS y control H_2O_2 . Los picos de fluorescencia aumentan en 5000 μM de PFHxS en comparación con la fluorescencia de espermatozoides sin capacitar. N=5 por duplicado.

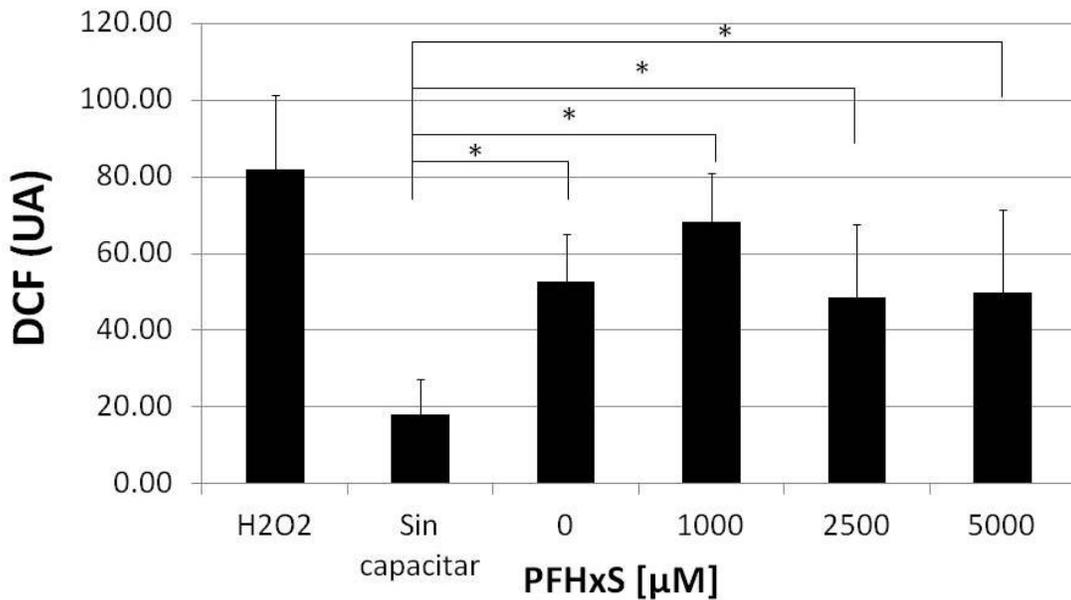


Figura 12. Efecto de PFHxS sobre los niveles de EROS de espermatozoides de cerdo *in vitro*. Hay diferencias significativas entre espermatozoides sin capacitar con 0 μM de PFOS y los demás concentraciones. No hay cambios de EROS conforme aumenta la concentración de PFHxS. N=5 por duplicado, se muestran la media y la desviación estándar de cada grupo. (UA=Unidades Arbitrarias de fluorescencia de DCF).

9.5 Patrones de fluorescencia de DCF

Durante el análisis en microscopía de fluorescencia con el colorante DCFH-DA, se observaron 5 patrones diferentes (figura 13), que se denominaron A, B, C y D. El patrón A se caracteriza por tener fluorescencia homogénea en la cabeza, el patrón B por tener ausencia de fluorescencia en la región ecuatorial, el patrón C por concentrar la fluorescencia por encima del cuello del espermatozoide, el patrón D presenta fluorescencia en la mitad posterior de la cabeza del espermatozoide y el patrón E por concentrar la fluorescencia en la zona apical. Se contaron 200 células y se determinó el porcentaje de cada uno de los patrones. Para determinar los

patrones predominantes en espermatozoides expuestos a PFOS, se utilizó el control H_2O_2 (a una concentración de 2000 μM), espermatozoides sin capacitar, espermatozoides capacitados (0 μM de PFOS) y espermatozoides tratados con CL_{50} de PFOS capacitados. En todos los casos se observaron los 5 patrones, sin embargo, los que mayormente predominaron fueron el patrón A y B (figura 13). En la figura 14 se aprecia que en presencia de H_2O_2 predomina el patrón A (57.59%), mientras que en espermatozoides sin capacitar este patrón disminuye (17.85%) y predomina el patrón B (57.14%). En el control sin PFOS y después de la capacitación predomina el patrón A (46.04%), éste disminuye al capacitar los espermatozoides con CL_{50} de PFOS (36.63%), igualándose con el patrón B (37.63%). Con estos resultados podemos sugerir que el patrón A corresponde con la producción de EROS.

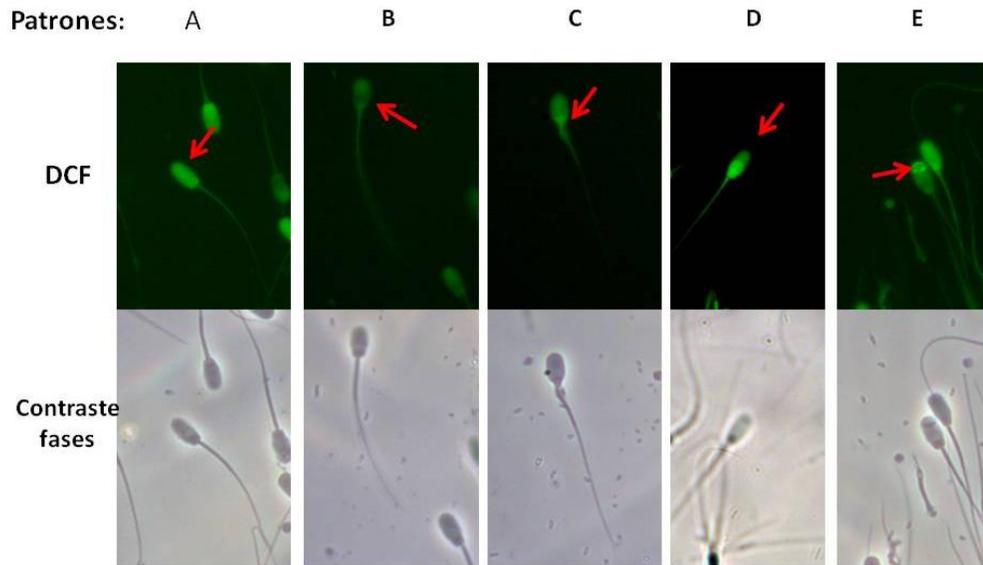


Figura 13. Patrones de fluorescencia de DCF encontrados en espermatozoides de cerdo. Los patrones se denominaron como A, B, C, D y E, podemos considerar que la mayor intensidad de fluorescencia (patrón A) corresponde con la producción de EROS.

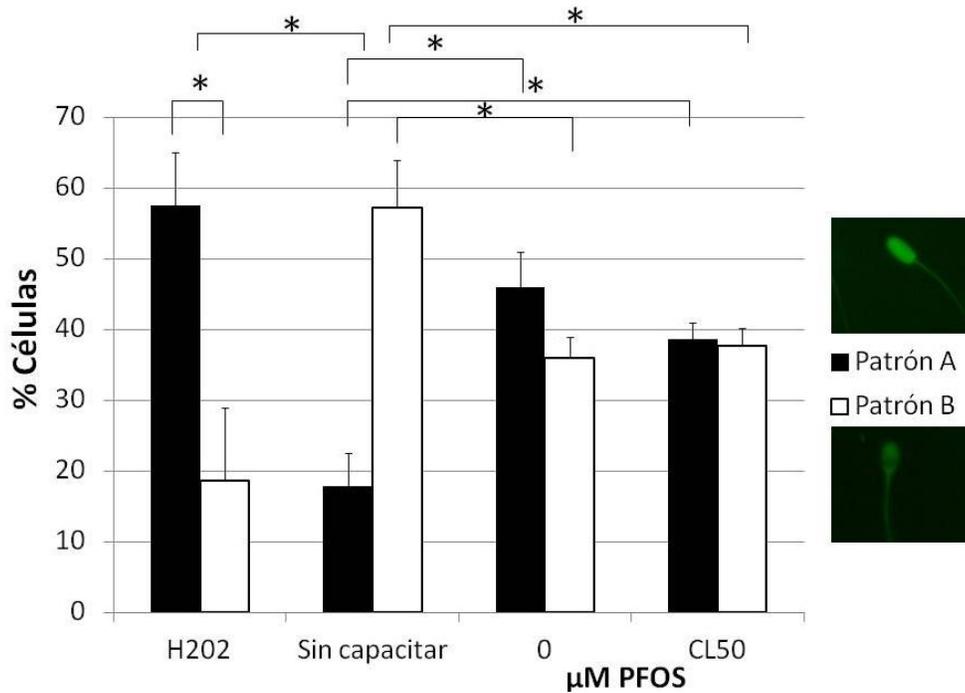


Figura 14. Patrones A y B en espermatozoides expuestos a PFOS. El patrón A es predominante en el control H₂O₂ y en el control 0 μM de PFOS. El patrón B predomina en espermatozoides sin capacitar y se iguala con el patrón A en espermatozoides expuestos con CL₅₀ de PFOS. Se muestra la media y la desviación estándar, N=5 por duplicado.

Para evaluar los patrones predominantes en espermatozoides expuestos a PFHxS, se utilizó el control H₂O₂ (2 mM), espermatozoides sin capacitar, 0 μM de PFHxS capacitados y 5000 μM de PFOS capacitados. En todos los casos se observaron los 5 patrones, sin embargo, los que en su mayoría predominaron fueron el patrón A y B (figura 15). En el control H₂O₂ predomina el patrón A (61.5%), mientras que en espermatozoides sin capacitar este patrón disminuye (19%) y predomina el patrón B (59%). En 0 μM de PFHxS de espermatozoides capacitados predomina el patrón A (49%) en comparación con el patrón B (34%), manteniéndose la prevalencia del

patrón A en los espermatozoides capacitados con 5000 μM de PFHxS (50.5%) en comparación con el patrón B (36%). Con estos resultados se puede concluir que el patrón A está presente cuando hay más EROS.

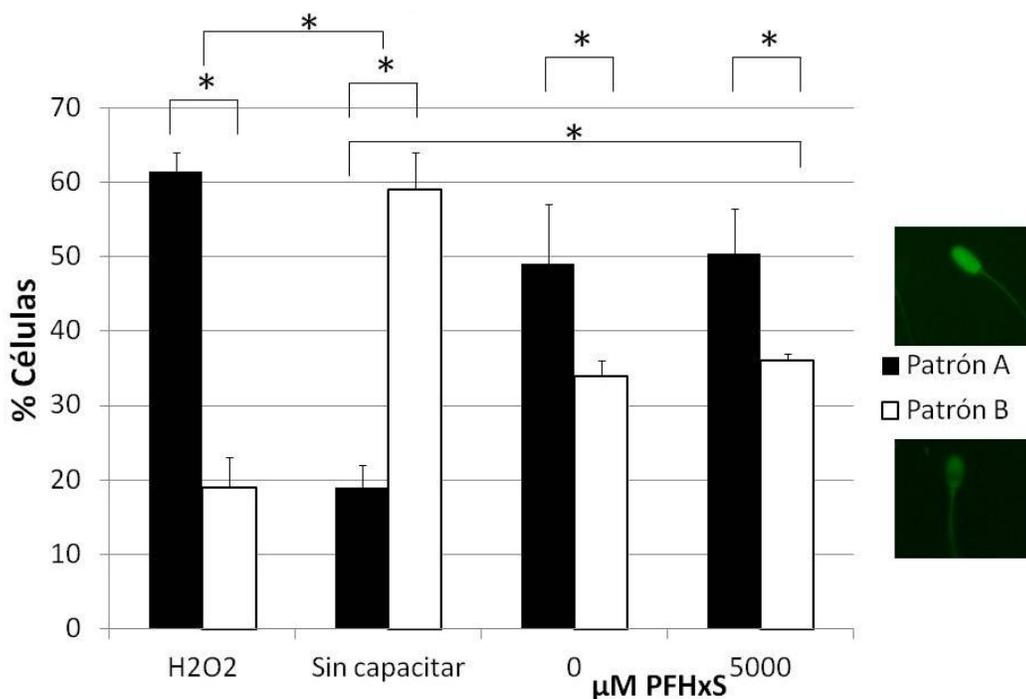


Figura 15. Células con patrones A y B en espermatozoides expuestos a PFHxS. El patrón A es predominante en el control H₂O₂ y en el control 0 μM de PFOS. El patrón B predomina en espermatozoides sin capacitar y se iguala con el patrón A en espermatozoides expuestos con CL₅₀ de PFOS. Se muestra la media y la desviación estándar, N=5 por duplicado.

10 Discusión

En el presente trabajo se comprobó que el tiempo de capacitación óptimo fue de 4 horas presentándose un 71.5% de espermatozoides capacitados coincidiendo con los valores ya antes obtenidos en nuestro grupo de laboratorio (Maravilla-Galván *et al.*, 2009), por lo tanto se tomó este tiempo para inducir el proceso de capacitación en los experimentos. Se observó que disminuye la viabilidad de los espermatozoides conforme se aumenta la exposición a PFOS. Se determinó la CL_{50} para PFOS que corresponde a 460 μM y la CL_{50} para PFHxS que fue de 1922 μM . Se observó que el PFOS afecta la movilidad de los espermatozoides, disminuye e incluso se anula a concentraciones altas de PFOS coincidente con lo reportado por Shi y Zhou (2010) en los que ante la exposición de PFOS en espermatozoides de pez Cebra decreció el porcentaje de movilidad curva-lineal y angular. Además de la alteración de la movilidad, nosotros encontramos formación de aglutinados que se incrementan conforme aumenta la exposición al tóxico y por lo tanto afecta a su movilidad. Al exponer los espermatozoides durante la capacitación con el tóxico, se observó una disminución gradual en el proceso de capacitación al incrementar la concentración de PFOS. Se determinó que la capacitación *in vitro* se inhibió a la concentración de 273.86 μM , y la inhibición de la RA fue de 110.19 μM dichas concentraciones son relativamente bajas. Durante la capacitación espermática, ocurren varios eventos celulares, bioquímicos y moleculares, que permiten que el espermatozoide pueda fertilizar al ovocito; entre ellos ocurre la hiperactivación del espermatozoide que corresponde a un aumento en la movilidad espermática. Dicho evento se encuentra

relacionado con la entrada de calcio por canales iónicos que permite la activación de vías de señalización necesarias para la fosforilación de proteínas que son las encargadas del inicio de la movilidad flagelar. La fosforilación requiere de la activación de la vía PKA (Protein Kinase A), la cual a su vez, es activada por la adenilato ciclasa soluble por un aumento de AMPc, la producción de AMPc; a su vez es activada por la entrada del ion bicarbonato y de calcio (Garner y Hafez, 1993). Se reportó 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 calcio tipo L disminuyeron significativamente cambiando el potencial de membrana y como consecuencia alterando la cinética del calcio en relación con la toxicidad de PFOS. Estos canales de calcio tipo L se encuentran en el espermatozoide y al ser bloqueados con verapamil, las características específicas del estado de alta movilidad fueron completamente anuladas indicando que son elementales para la movilidad del espermatozoide (Takahashi *et al.*, 2013). Como se sabe, la capacitación está ampliamente ligada con la entrada de calcio que dispara la vía de señalización para la activación de proteínas responsables de la movilidad espermática como las dineínas del axonema flagelar. 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 la RA en relación con una disminución del calcio intracelular. CatSper, un canal específico de espermatozoide que modula el flujo de calcio intracelular fue inhibido por ketamina (He *et al.*, 2016). En el presente estudio encontramos que el PFOS inhibe la movilidad y la RA. Es probable que el

daño observado en la movilidad espermática en presencia de PFOS, puede ser debido al nivel de canales de calcio como, por ejemplo, los canales tipo L o CatSper que se encuentran en el espermatozoide y de esta manera se afecte la capacitación y RA. Otro de los posibles motivos por los que se presenta disminución en la capacitación y en la RA puede ser debido a la disminución paralela de la viabilidad.

Por otro lado, se ha reportado que un incremento de calcio es necesario para la capacitación por medio de la regulación de EROS como ion superóxido (O'flaherty *et al.*, 2006). Se ha indicado que la producción de EROS en el espermatozoide es un evento temprano de la capacitación. Las EROS son requeridos para la salida del colesterol, para regular la producción de AMPc por medio de la activación de la Adenilato ciclasa y la regulación de las fosfatasas para la regulación de la fosforilación (Jin y Yang, 2017), así como son también necesarios para dar inicio a la vía (Extracellular Signal-regulated Kinase) intracelular que es necesaria para realizar la capacitación y RA (O'flaherty *et al.*, 2006). En este trabajo se observó que efectivamente durante la capacitación hay un aumento en la producción de EROS. Sin embargo, al incrementar la exposición a PFOS, los niveles de EROS bajaron consistentemente. Estos resultados coinciden con la disminución de la capacitación. A diferencia con lo anterior, con el PFHxS se observó que los niveles de EROS se mantienen constantes en las concentraciones utilizadas, además de que la capacitación y RA no se modificaron.

Nuestros resultados indican que el PFOS altera el proceso de capacitación, probablemente por la disminución de los niveles de EROS. Gadea *et al.* (2005)

reportan que un decremento en la generación de EROS es responsable de una baja desorganización lipídica y de la redistribución de proteínas de membrana, las cuales, son eventos importantes para la capacitación del espermatozoide Sin embargo, existe controversia en cuanto a los niveles de EROS producidos por PFOS, en otros tipos celulares hay evidencias de que las EROS se incrementa en presencia de PFCs. Por ejemplo, Liu (2016) observó, en *Escherichia coli*, que el estrés oxidante se incrementó al aumentar la concentración de los PFCs lo que provoca desintegración de la membrana así como su muerte. Lee *et al.* (2012) estudiaron en rata el efecto de PFOS en células granulares del cerebelo, mostraron que se induce apoptosis vía EROS mediada por la vía de señalamiento PKC (Protein Kinase C). Encontraron que la exposición a PFOS resulta en la hipergeneración de EROS en embriones de pez Cebra e induce actividad de enzimas antioxidantes mediado por la activación de (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) funcionando este factor como un protector contra el estrés oxidante inducido por PFOS (Shi y Zhou, 2010). Por otro lado también hay evidencia de que EROS pueda disminuir la respuesta al estrés oxidante, Khalighi *et al.* (2016) realizaron experimentos en ratas y observaron que en presencia de los PFCs se disminuyó la producción de malondialdehído, que es un marcador de estrés oxidante. Estas evidencias indican que PFCs pueden generar un desequilibrio en la producción de EROS, incrementando o disminuyendo su concentración, que puede generar alteraciones en la funcionalidad de la célula. En el caso del espermatozoide, un desequilibrio en la producción normal de niveles de EROS puede afectar su capacidad fertilizante, ya que es necesaria la presencia de éstos para que se dispare la capacitación como se mostró en nuestros resultados, en

los cuales, disminuyen gradualmente los niveles de EROS en paralelo con la disminución de la capacitación, siendo más notorio en las concentraciones cercanas correspondientes a CI_{50} de la capacitación y a CL_{50} de PFOS.

Hasta la fecha no se ha identificado la enzima (oxidasa) responsable de la producción de EROS necesarias para la capacitación espermática, el papel que juega EROS durante la capacitación es diverso y muy complejo, involucra la activación de varios blancos localizados en la membrana plasmática y otros compartimientos espermáticos. Se sabe que O_2^{\bullet} (radical superóxido)— y NO^{\bullet} (óxido nítrico) activan la Adenilato ciclasa que produce cAMP durante la capacitación espermática, de esta forma se activa la cascada de señalización PKA que es esencial para que se lleve a cabo la fosforilación de tirosina de proteínas asociadas a la capacitación, hiperactivación y RA. La NO^{\bullet} sintasa es una de las enzimas candidatas para cumplir el papel de la enzima oxidasa responsable de la generación de EROS. (O'Flaherty, 2015). Los Inhibidores de la NO^{\bullet} sintasa disminuyen la disponibilidad de EROS y causa baja producción de cAMP (Gangwar y Atreja, 2015).

Por otro lado, las aglutinaciones ocurren solo en espermatozoides móviles y comienza cuando se activa el movimiento flagelar (Wilson, 1954). La aglutinación de los espermatozoides se ha relacionado con una disminución de la movilidad e incapacidad de que el espermatozoide pueda localizarse cerca del ovocito a fecundar, y los pacientes con aglutinación positiva poseen problemas de infertilidad (Lynch *et al.*, 1986). Existen muchos factores por los que se puede dar la aglutinación *in vitro* y se pueden mencionar entre otros a estresores físico-químicos

como alta concentración, choque térmico, lavados drásticos o pHs extremos (Mann, 1964), temperatura (Wilson, 1954) o incluso el mismo medio TALP-HEPES de capacitación llega a inducir aglutinación cabeza-cabeza rápida y persistente pero moderada (Leahy *et al.*, 2016a). Algunos metales como cobalto, fierro y cobre pueden llegar a producir aglutinación. El cobre causa masas de aglutinación a la concentración de 100 μ M y se acompaña de baja movilidad. Los espermatozoides poseen proteínas con grupos SH en su membrana que les permite unirse uno al otro formando enlaces disulfuro. Estos enlaces pueden ser reducidos por D-penicilamina que les dona un electrón y de esa manera PEN previene la aglutinación o la vuelve reversible, el cobre roba de nuevo este electrón induciendo a la aglutinación permitiendo que los espermatozoides se unan por medio de los enlaces disulfuro (Leahy *et al.*, 2016b). Puede ser que el PFOS esté ejerciendo la acción de inducir aglutinación de manera similar al cobre o por algún intermediario relacionado con ROS. Sin embargo, aún no se sabe cuál es la razón por la que el PFOS produce aglutinaciones en los espermatozoides y como consecuencia disminuir su movilidad, por lo que queda abierto a un amplio tema para investigar.

11 Conclusiones

- Se obtuvo un número de espermatozoides capacitados adecuado y conforme a lo esperado, alrededor del 70-80%.
- La concentración letal media (CL_{50}) con PFOS fue de 460.55 μM y con PFHxS fue de 1922.15 μM .
- La concentración de inhibición media de la capacitación con PFOS fue de 273.86 μM y la de inhibición media de la RA fue de 110.19 μM .
- Disminuyeron los parámetros de viabilidad, movilidad progresiva, capacitación y RA de manera proporcional al aumento de las concentraciones de PFOS a las que fueron expuestos los espermatozoides.
- Por el contrario, al aumentar la concentración de PFOS, aumentaron los aglutinados en cuanto a número y a tamaño.
- Se obtuvo un aumento en los niveles de EROS durante la capacitación conforme a lo que se esperaba.
- Los niveles de EROS durante la capacitación disminuyeron desde que los espermatozoides fueron expuestos a 230 μM de PFOS.
- No hubo efecto de PFHxS sobre la movilidad, aglutinación, viabilidad, capacitación, RA de los espermatozoides, ni de los niveles de EROS.

12 Perspectivas

Determinar si hay un desequilibrio en los niveles de EROS en espermatozoides expuestos a los PFCs durante la capacitación con citometría de flujo para una mejor precisión de los niveles de EROS.

Abundar en el estudio del estatus de la actividad mitocondrial de los espermatozoides tratados y su relación con la movilidad flagelar, así como en el flujo de Ca^{2+}_i durante la capacitación y la RA inducida.

13 . Bibliografía

1. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B y Irvine S (1997). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Molecular reproduction and development* **47**(4): 468-482.
2. Alexander BH y Olsen GW (2007). Bladder cancer in perfluorooctanesulfonyl fluoride manufacturing workers. *Annals of epidemiology* **17**(6): 471-478.
3. ATSDR. (2015). Resumen de salud pública perfluoroalquilos. 2017, from <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>.
4. Ball BA, Vo AT y Baumber J (2001). Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American journal of veterinary research* **62**(4): 508-515.
5. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V y Davies-Morel MC (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology* **21**(6): 895-902.
6. Björndahl L, Söderlund I y Kvist U (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human reproduction* **18**(4): 813-816.
7. Campuzano AD (2014). Efecto del sulfonato de perfluorooctano PFOS en las uniones comunicantes de los COCs porcinos durante la maduración in vitro (MIV). Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
8. Cassone CG, Vongphachan V, Chiu S, Williams KL, Letcher RJ, Pelletier E, Crump D y Kennedy SW (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.
9. Clarkson PM y Thompson HS (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition* **72**(2): 637s-646s.
10. Contreras H y Bustos-Obregón E (1999). Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **284**(3): 355-359.
11. DasGupta D (1993). An overview of artificial immune systems and their applications. Artificial immune systems and their applications, Springer: 3-21.
12. EPA U (2012). Emerging contaminants-perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA). *Emerging contaminants fact sheet—PFOS and PFOA*.
13. Eriksen KT, Raaschou-Nielsen O, McLaughlin JK, Lipworth L, Tjønneland A, Overvad K y Sørensen M (2013). "Association between plasma PFOA and PFOS

levels and total cholesterol in a middle-aged Danish population." PloS one **8**(2): e56969.

14. Fei C, McLaughlin JK, Lipworth L y Olsen J (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Human Reproduction*.

15. Florman HM y Ducibella T (2006). Fertilization in mammals. *Knobil and Neill's physiology of reproduction* **3**: 55-112.

16. Forum USEPARA (2005). Guidelines for carcinogen risk assessment, Risk Assessment Forum, US Environmental Protection Agency.

17. Gadea J, Gumbao D, Matás C y Romar R (2005). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of andrology* **26**(6): 749-756.

18. Gadella BM y Luna C (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology* **81**(1): 74-84.

19. Gangwar D y Atreja S (2015). Signalling events and associated pathways related to the mammalian sperm capacitation. *Reproduction in Domestic Animals* **50**(5): 705-711.

20. Garner DL y Hafez E, S .E. (1993). Spermatozoa and seminal plasma. Reproduction in Farm Animals. ESE Hafez. Philadelphia, Lea & Febiger: 165-187.

21. Giesy JP y Kannan K (2001). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environmental science & technology* **35**(7): 1339-1342.

22. Harada KH, Ishii TM, Takatsuka K, Koizumi A y Ohmori H (2006). Effects of perfluorooctane sulfonate on action potentials and currents in cultured rat cerebellar Purkinje cells. *Biochemical and biophysical research communications* **351**(1): 240-245.

23. Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R y Ramsey JJ (2004). Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiologica Scandinavica* **182**(4): 321-331.

24. He Y, Zou Q, Li B, Chen H, Du X, Weng S, Luo T y Zeng X (2016). Ketamine inhibits human sperm function by Ca²⁺-related mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* **478**(1): 501-506.

25. Hikita H, Kodama T, Tanaka S, Saito Y, Nozaki Y, Nakabori T, Shimizu S, Hayashi Y, Li W y Shigekawa M (2015). Activation of the mitochondrial apoptotic pathway produces reactive oxygen species and oxidative damage in hepatocytes that contribute to liver tumorigenesis. *Cancer Prevention Research* **8**(8): 693-701.

26. Hundley S, Sarrif A y Kennedy Jr G (2006). Absorption, distribution, and excretion of ammonium perfluorooctanoate (APFO) after oral administration to various species. *Drug and chemical toxicology* **29**(2): 137-145.

27. Jacquet N, Maire M, Landkocz Y y Vasseur P (2012). Carcinogenic potency of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Archives of toxicology* **86**(2): 305-314.

28. Jiménez I, González-Márquez H, Ortiz Ro, Herrera JA, García A, Betancourt M y Fierro R (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* **59**(5): 1171-1180.
29. Jin S-K y Yang W-X (2017). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget* **8**(2): 3600.
30. Joensen UN, Bossi R, Leffers H, Jensen AA, Skakkebaek NE y Jørgensen N (2009). Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environmental health perspectives* **117**(6): 923.
31. Joensen UN, Veyrand B, Antignac J-P, Jensen MB, Petersen JH, Marchand P, Skakkebaek NE, Andersson A-M, Le Bizec B y Jørgensen N (2013). PFOS (perfluorooctanesulfonate) in serum is negatively associated with testosterone levels, but not with semen quality, in healthy men. *Human reproduction* **28**(3): 599-608.
32. Khalighi Z, Rahmani A, Cheraghi J, Ahmadi MRH, Soleimannejad K, Asadollahi R y Asadollahi K (2016). Perfluorocarbon attenuates inflammatory cytokines, oxidative stress and histopathologic changes in paraquat-induced acute lung injury in rats. *Environmental toxicology and pharmacology* **42**: 9-15.
33. Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A y Seed J (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological sciences* **99**(2): 366-394.
34. Leahy T, Rickard J, Aitken R y de Graaf S (2016a). Penicillamine prevents ram sperm agglutination in media that support capacitation. *Reproduction* **151**(2): 167-177.
35. Leahy T, Rickard JP, Aitken RJ y de Graaf S (2016b). D-penicillamine prevents ram sperm agglutination by reducing the disulphide bonds of a copper-binding sperm protein. *Reproduction* **151**(5): 491-500.
36. Lee H-G, Lee YJ y Yang J-H (2012). Perfluorooctane sulfonate induces apoptosis of cerebellar granule cells via a ROS-dependent protein kinase C signaling pathway. *Neurotoxicology* **33**(3): 314-320.
37. Liu M (2016). Capacitation-associated glycocomponents of mammalian sperm. *Reproductive sciences* **23**(5): 572-594.
38. Lynch DM, Leali BA y Howe SE (1986). A comparison of sperm agglutination and immobilization assays with a quantitative ELISA for anti-sperm antibody in serum. *Fertility and sterility* **46**(2): 285-292.
39. Mann T (1964). The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*.
40. Maravilla-Galván R, Fierro R, González-Márquez H, Gómez-Arroyo S, Jiménez I y Betancourt M (2009). Effects of atrazine and fenoxaprop-ethyl on capacitation and the acrosomal reaction in boar sperm. *International journal of toxicology* **28**(1): 24-32.
41. Muller K, Pomorski T, Muller P y Herrmann A (1999). Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *Journal of cell science* **112**(1): 11-20.

42. Murphy MP (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* **417**(1): 1-13.
43. O'Flaherty C (2015). Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian journal of andrology* **17**(4): 583.
44. O'flaherty C, de Lamirande E y Gagnon C (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine* **41**(4): 528-540.
45. Paul AG, Jones KC y Sweetman AJ (2008). A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environmental science & technology* **43**(2): 386-392.
46. Pimentel-González D, Campos-Montiel R, Cisneros-Ortiz M, Monroy-Hermosillo O y Vernon-Carter E (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).
47. Pond WG y Houpt KA (1978). *The biology of the pig*, Cornell University Press.
48. Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC y Korzeniowski SH (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental science & technology* **40**(1): 32-44.
49. Shi X y Zhou B (2010). The role of Nrf2 and MAPK pathways in PFOS-induced oxidative stress in zebrafish embryos. *Toxicological Sciences*: kfq066.
50. Sierra Vargas MP, Grenfell G, Martín A, Olivares Corichi I, Torres Ramos YD y Hicks Gómez JJ (2004). Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* **17**(2): 135-148.
51. Silvestre MT (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, Universidad Autónoma Metropolitana.
52. Sundström M, Hart J, Chang S, Ehresman D, Gorman G, Noker P, Olsen G, Bergman Å y Butenhoff J (2009). Comparative pharmacokinetics of perfluorohexanesulfonate (PFHxS) in rats and monkeys. *Dioxin* 2009.
53. Takahashi T, Kutsuzawa M, Shiba K, Takayama-Watanabe E, Inaba K y Watanabe A (2013). Distinct Ca²⁺ channels maintain a high motility state of the sperm that may be needed for penetration of egg jelly of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Development, growth & differentiation* **55**(7): 657-667.
54. Tash JS y Bracho GE (1999). Microgravity alters protein phosphorylation changes during initiation of sea urchin sperm motility. *The FASEB journal* **13**(9001): S43-S54.
55. Toft G, Jönsson B, Lindh C, Giwercman A, Spano M, Heederik D, Lenters V, Vermeulen R, Rylander L y Pedersen H (2012). Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in Arctic and European populations. *Human reproduction*: des185.

56. United Nations Environment Program (UNEP) (2009). Independent Environmental Assessment: Beijing 2008 Olympic Games. U.N. Environ. Programme, Nairobi, Kenya.
57. Valdés A y Muir-Leresche K (1993). Agricultural policy reforms and regional market integration in Malawi, Zambia, and Zimbabwe, Intl Food Policy Res Inst.
58. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P y Kopf GS (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." *Development* **121**(4): 1129-1137.
59. Wilson L (1954). "Sperm agglutinins in human semen and blood." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **85**(4): 652-655.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00176

Matrícula: 2153803842

EFFECTO DE LOS COMPUESTOS PERFLUORADOS PFHxS y PFOS EN LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO *in vitro*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 28 del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
- DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ
- DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ
- DRA. EDITH ARENAS RIOS
- DRA. ELIA ROLDAN REYES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: PAOLA BERENICE ORTIZ SANCHEZ

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

Aprobar

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

SECRETARIA

DRA. ELIA ROLDAN REYES