



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CIENCIAS DE LA SALUD.

Maestría en Biología Experimental.

“EFECTO DEL FENOXAPROP-ETIL (FE) SOBRE LA CAPACITACIÓN
DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO *IN VITRO*.”

T E S I S

para obtener el grado de **Maestro en Biología Experimental** presenta:

B. E. Alejandro Hernández López.

Director:

Dr. José Miguel Betancourt Rule.

Asesoras:

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz.

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor.

México D. F., noviembre de 2007.

COMITÉ TUTORAL.

Director:

Dr. José Miguel Betancourt Rule.

Profesor Titular "C" T.C. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. bet@xanum.uam.mx

Asesoras:

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz.

Profesora Titular "C" T.C. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. arom@xanum.uam.mx

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

Investigadora. Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
angelica@correo.biomedicas.unam.mx

Dra. Rosa María Vigueras Villaseñor.

Investigadora. Laboratorio de Histomorfología, Instituto Nacional de Pediatría.
marcoviv@servidor.unam.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. El posgrado se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 309-0 y en el Padrón de Programas del PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca número 192910 otorgada para la realización de este trabajo.

Proyecto de investigación financiado parcialmente por el CONACYT con el convenio 5-37923-B.

Al laboratorio de Biología Celular, y al laboratorio de Biología Celular y Citometría del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa donde se realizó el presente trabajo.

Al M en C. Eduardo Casas por su apoyo en la preparación del herbicida y los tratamientos estadísticos.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca folio 07BTM132 otorgada para escritura de esta tesis.

DEDICATORIAS.

Deseo dedicar la presente tesis a todos los que de alguna manera participaron en su conclusión.

En el laboratorio de Biología Celular:

A el doctor Miguel Betancourt por su gran paciencia, invaluable ayuda y consejo en la dirección del trabajo experimental y la escritura de la tesis.

A la doctora Rocio Ortiz como un agradecimiento por su apoyo durante todos estos años, por su imparcialidad y gran tino en los consejos para la realización de este trabajo.

A las doctoras Rosa Maria Viguera y Angélica Moreno por su apoyo y consejos.

A la maestra Edith Cortes por su invaluable apoyo y paciencia en el manejo del citometro de flujo.

A la doctora Yvonne Ducolomb por su apoyo.

En particular a la doctora Reyna Fierro por su apoyo y ayuda en los momentos difíciles.

Al Maestro Eduardo Casas por su comprensión y ayuda en los aspectos técnicos del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí el trabajo y una gran cantidad de momentos agradables: A Alicia, Lupita , Filiberto, Gabriel, Haydee, Zayil, Marie y Marisol.

A mi familia:

A mis papás Lidia López Portillo y Cirilo Hernández Torres a quienes agradezco primero el haberme dado la vida y luego, su apoyo incondicional en el transcurso de la misma a pesar de los inconvenientes. Por su ejemplo de valentía, tenacidad y superación. Gracias.

A mis hermanos Angélica, Héctor y María Eugenia.

A mis sobrinos Ana Lidia y Rafael chico.

A “Godita” López Portillo.

A mi cuñado Rafael.

A Xochil por el amor incondicional con que comparte todos los aspectos de la vida.

A mis suegros Don Juan Avila y María del Refugio Alejandre.

A Pilar e Ivan.

Y no puede faltar la maestra Teresa Fonseca a quien considero de mi familia. Gracias por su apoyo y consejo.

A mis amigos:

Aurora, Rosa, Pricila, Román, Arturo y Armando.

A la Pelusa y al Toby *in memoria*.

JURADO DEL EXAMEN:

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz. (presidenta)

Profesora Titular "C" T.C. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. arom@xanum.uam.mx

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor. (Secretaria)

Investigadora. Laboratorio de Histomorfología, Instituto Nacional de Pediatría.
marcoviv@servidor.unam.mx

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza. (Vocal)

Investigadora. Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
angelica@correo.biomedicas.unam.mx

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana. (Vocal)

Profesora Titular "C" T.C. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. reyna@xanum.uam.mx

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT.....	XIII
1.1 PLAGUICIDAS.....	1
1.2 HERBICIDAS.	2
1.2.1 Herbicidas Inorgánicos	3
1.2.2 Herbicidas Orgánicos	3
1.2.3 Fenoxaprop-Etil.	6
1.3 TOXICIDAD DE LOS HERBICIDAS.	7
1.4 REPROTOXICIDAD.	9
1.5 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.	11
1.6 CAMBIOS CELULARES OBSERVADOS EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.	12
1.6.1 Movilidad espermática.....	12
1.6.2 Cambios en la superficie durante la capacitación espermática.	13
1.7 CITOMETRIA DE FLUJO.....	15
1.8 ANALISIS DE LA VIABILIDAD.....	16
2 ANTECEDENTES.....	17
3 JUSTIFICACIÓN.....	20
4 HIPÓTESIS:.....	21

5	OBJETIVO GENERAL.....	22
6	OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
7	MATERIALES Y MÉTODOS.	23
7.1	OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA MUESTRA DE SEMEN.....	23
7.2	DILUCIÓN DE LA MUESTRA.....	23
7.3	ENSAYOS CON ETANOL.	24
7.4	ENSAYOS DE CAPACITACIÓN.....	25
7.5	CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD:	25
7.5.1	Tinción con Eosina-Nigrosina.....	25
7.5.2	Análisis de viabilidad con IP.....	26
7.6	CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACITACIÓN:	26
7.7	TRATAMIENTO CON EL HERBICIDA FENOXAPROP-ETIL (FE).	27
7.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
8	RESULTADOS	29
8.1	VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE CF CON IP RESPECTO DE LA MICROSCÓPICA, USANDO EOSINA-NIGROSINA.	29
8.2	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CAPACITACIÓN EVALUADA CON M540 Y VIABILIDAD EVALUADA CON YODURO DE PROPIDIO (IP).	32
8.3	EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A ETANOL AL 5% EN MEDIO TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR POR UNA HORA SOBRE LA VIABILIDAD.....	35

8.4	EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A ETANOL EN CONCENTRACIONES INFERIORES AL 5% POR UNA HORA EN MEDIO TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR, SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES.	38
8.5	EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A 0.5, 1, 2 Y 3% DE ETANOL POR UNA HORA EN TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR SOBRE LA CAPACITACIÓN.	41
8.6	EFFECTO SOBRE LA VIABILIDAD POR EXPOSICIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A 50, 100, 200 Y 300 μM DE FE EN TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR.	44
8.7	EFFECTO SOBRE LA CAPACITACIÓN POR EXPOSICIÓN DE ESPERMATOZOIDES POR UNA HORA A 50, 100, 200 Y 300 μM DE FE TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR.	47
9	DISCUSIÓN.	50
10	CONCLUSIONES.	57
11	APENDICE 1.	58
11.1	Medios y Soluciones.	58
11.1.1	PBS	58
11.1.2	TALP-HEPES.	59
11.1.3	TALP-HEPES suplementado.	60
11.1.4	TINCIÓN CON EOSINA-NIGROSINA.	60
11.1.5	TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO.	60
11.1.6	TINCIÓN CON MEROCIANINA 540.	60
12	REFERENCIAS.	61

ABREVIATURAS.

ACCasa.- Acetil coenzima A carboxilasa.

AMPc.- Adenosin monofosfato cíclico.

BCF.- Beat/cross frequency.

CASA.- Computarized digital image analysis.

CF.- Citometría de flujo.

Con-A.- Concanavalina A.

DL₅₀.- Dosis letal 50.

EN.- Eosina-nigrosina.

EPA.- Agencia de Protección al medio ambiente.

FAO.- Fondo de las Naciones unidas para la Agricultura.

FDA.- Administración de drogas y alimentos.

FE.- Fenoxaprop-etil o ácido propanoico de (rs) 2 [4- (6-cloro -1,3-benzoxazol- 2-iloxil) fenoxilo).

FL.- Fluorescencia.

FSC.- Forward light scatter.

hpt.- Horas posteriores a la hora de tratamiento.

IP.- Yoduro de Propidio.

M540.- Merocianina 540.

NOEL.- Toxicidad crónica de efectos no observados.

OMS.- Organización Mundial de la Salud.

PBS.- Solución salina de fosfatos.

PKA.- fosfocinasa A.

SSC.- side light scatter.

WGA.- Wheat Germ agglutinin.

RESUMEN

Debido a que existen limitaciones para establecer los efectos específicos de un herbicida sobre las diferentes funciones de un organismo, es necesario el uso de modelos de estudio tanto *in vivo* como *in vitro*. El Fenoxaprop-Etil (FE) es un herbicida de uso común y aunque no hay reportes sobre su riesgo toxicológico, en un trabajo previo, realizado en el Laboratorio de Biología Celular de la UAM-I, se estableció que tiene efectos sobre la viabilidad y la movilidad de espermatozoides. Esto plantea la posibilidad de que la capacitación espermática se encuentre afectada. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del FE sobre la capacitación espermática *in vitro*. Los experimentos se realizaron en espermatozoides conservados por 24h en diluyente comercial. Primero se validó la técnica para evaluar la viabilidad por citometría de flujo (CF) con la adición de yoduro de propidio (IP), y se comparó con la técnica tradicional por microscopía óptica con eosina nigrosina (EN), no mostrando diferencia significativa entre ambas técnicas, por lo que en los estudios subsecuentes sólo se utilizó la técnica citométrica. En segundo lugar se probó el efecto de la exposición de los espermatozoides durante una hora al solvente del FE (etanol al 5%) en medio TALP-HEPES, concentración máxima usada en estudios previos. Dado que en las condiciones de este experimento el etanol sí afectó la viabilidad, se realizó otro donde se probaron concentraciones menores (0.5, 1, 2 y 3%) y con estas, ni la viabilidad ni la capacitación se vieron afectadas, por lo que sólo se usaron éstas concentraciones de etanol para diluir al FE. Con esta información se procedió a determinar el efecto del FE sobre la viabilidad, para lo cual se tomaron dos alícuotas de cada una de las muestras. La primera se sometió a tratamiento por una hora con etanol a 0, 0.5, 1, 2 y 3% como control de solvente del FE. La segunda se sometió a tratamiento una hora con 0, 50, 100, 200 y 300 μM de FE en medio TALP-HEPES. Después del tratamiento por una hora con etanol o con FE, los espermatozoides se lavaron e incubaron en medio TALP-HEPES suplementado con piruvato de sodio y albúmina sérica bovina (condiciones capacitantes). Se tomaron alícuotas a las 0, 1 y 3 horas posteriores al tratamiento

(hpt). Se cuantificaron los porcentajes de viabilidad con IP y la capacitación con merocianina 540 (M540) por citometría de flujo. Los resultados indican que 0 hpt a las concentraciones 200 y 300 μ M de FE, disminuyen significativamente la viabilidad de los espermatozoides con respecto al control. A 1 hpt todas las concentraciones la afectan significativamente. Mientras que a 3 hpt, solo la concentración 300 μ M la continúa afectando.

Se evaluó la capacitación y se encontró que la exposición de los espermatozoides a FE en concentraciones de 50, 100, 200, y 300 μ M favorece el intercalamiento de la M540 en la membrana del espermatozoide con respecto al control de manera significativa a 0 hpt y 1 hpt, mientras que a las 3 hpt solo lo continúa haciendo en la concentración de 300 μ M.

Los resultados demuestran que el FE reduce la viabilidad de los espermatozoides e incrementa el intercalamiento de la M540, aunque no se puede afirmar que se estén capacitando. Una posible explicación es que el FE puede estar afectando la membrana externa del espermatozoide promoviendo la salida del colesterol y lipoperoxidando a los fosfolípidos como lo hace en plantas; ambos eventos favorecen el intercalamiento de la M540. No se descarta que el FE interrumpa una vía de señalización e impida al espermatozoide llevar la secuencia normal de los eventos relacionados con la capacitación.

ABSTRACT.

Due to limitations to study the specific effects of herbicide over different functions in organisms; it is necessary the use models, *in vivo* as well as *in vitro*. Fenoprop-Etil (FE) is a common herbicide, although there are not reports about its toxic risk, in a previous study made in the Laboratory of Cell Biology at UAM-I, it was established its effect on sperm viability and motility. This raises the possibility that the sperm capacitation would be affected. The aim of this study was to determinate the effect of FE on the sperm capacitation *in vitro*. The experiments were made using fresh spermatozoa stored 24 hours in commercial diluent. First, step was to establish and validate the technique to evaluate the viability by flow citometry (CF) adding propidium iodide (IP) in comparison with the traditional microscopic technique with the addition of eosin-nigrosin (EN). There was not significant difference between both techniques. Then in the following studies, cytometric technique was used. After that, the effect of the sperm exposition to the solvent in the highest concentration (ethanol 5%) dissolved in TALP-HEPES medium, used in previous studies, was tested for 1 hour. Due that ethanol affected viability, it was made other assay testing lower concentrations (0.5, 1, 2 y 3%). In this case, neither viability nor the capacitation were affected, therefore, these ethanol concentrations were used to dissolve the FE. Whit this information was determined the FE effect on the viability and capacitation. Two aliquots from each sample were used. One was treated 1 hour with 0, 0.5, 1, 2 and 3% of ethanol as a control. Second aliquot was treated by 1 hour with 0, 50, 100, 200 and 300 μM FE in TALP-HEPES medium. After 1 hour of treatment spermatozoa were washed and incubated in TALP-HEPES medium supplemented with sodium piruvate and BSA for 0, 1 and 3 additional hours (hpt). It was quantified the viability with IP and capacitation with merocyanine 540 (M540) by flow cytometry. The results show that, 200 and 300 μM FE concentration, reduce significantly the sperm viability, respect to the control at 0 hpt. After one hpt it was significantly affected at all concentrations. Meanwhile 3 hpt the viability was only affected by the 300 μM

concentration. It was found that 0 hpt and 1 hpt, 50, 100, 200 and 300 μM FE concentrations facilitate the M540 intake in the sperm membrane, while 3 hpt it was only increased at 300 μM concentration. The results demonstrate that the FE reduced the spermatozoa viability and increased the M540 intake, although it does not necessarily represent spermatozoa capacitation. A probable explanation is that the FE can be affecting the external membrane, promoting the cholesterol releasing and oxidizing to the lipids on the membrane, as it does in plants. Both actions promote the M540 intake. Other possibility is that EF cut off a signalization pathway impairing the spermatozoa to follow the events related with the sperm capacitation.

INTRODUCCIÓN.

1.1 PLAGUICIDAS.

Desde el advenimiento de la agricultura, el hombre ha procurado optimizar la energía y los recursos invertidos en la obtención de un mejor rendimiento en los cultivos, pero a mediados del siglo XIX debido al incremento en la población y a su concentración en las ciudades, la agricultura pasó de autoconsumo a intensiva. Este fenómeno permitió el desarrollo de técnicas de cultivo auxiliadas por maquinaria y la construcción de sistemas de riego, además el progreso de la química permitió la elaboración de fertilizantes. Todo este esfuerzo se vio recompensado con un incremento inicial de la productividad, pero esta nueva abundancia generó la proliferación de plagas que mermaban la producción, ya fuera compitiendo por los nutrientes de los suelos recién fertilizados o atacando los alimentos durante su almacenamiento por lo que se hizo necesario reducir estas plagas con el uso de plaguicidas (Costa, 1986).

Los plaguicidas contribuyeron al mejoramiento de la productividad del campo a tal grado que en algunos países desarrollados sería imposible concebir la agricultura sin estas sustancias químicas, lo que ha llevado a su multiplicación y al desarrollo de nuevos productos con mayor efectividad, a precios cada vez más económicos (Ware, 2004).

Debido a la importancia que tienen los plaguicidas, algunas organizaciones se dieron a la tarea de difundir información concerniente a estas sustancias. Así, el Fondo de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO) define a los plaguicidas como: "sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal, especies indeseables de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos, otros productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos animales, o que pueden ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas" (OMS, 1990).

1.2 HERBICIDAS.

Los herbicidas son plaguicidas que permiten controlar el crecimiento de las malezas reemplazando los métodos mecánicos, su uso se ha incrementado en los últimos años debido a que es una forma más económica y efectiva de control (Costa, 1986).

El uso intensivo de herbicidas se creía limitado a América del Norte, Europa occidental, Japón, y Australia (Ware, 2004), aunque la utilización de estos compuestos también ha crecido en los países en desarrollo, con la desventaja de que en éstos no existen regulaciones para su uso, dificultando su control y el análisis de las consecuencias de su utilización (Caseley, 1996).

Otra razón por la que se dificulta el control del uso los herbicidas, es la amplia variedad de sustancias químicas y los diversos efectos inducidos por cada uno de ellos, lo que dificulta su clasificación. Sin embargo, se pueden distinguir de acuerdo con su selectividad, forma de uso, estructura química, etc.

Los herbicidas se denominan como “selectivos” cuando se usan para matar malezas sin causarle daño al cultivo. Como “no selectivos” cuando el propósito es matar toda la vegetación del terreno. En ambos casos se pueden aplicar al follaje de las malezas o al suelo que contiene las semillas o las plántulas. El término “verdadera selectividad” se refiere a la capacidad de un herbicida para afectar a un tipo específico de vegetación, lo que se logra cuando se aplica en el momento oportuno y a la concentración correcta. La selectividad también se puede lograr mediante la forma de aplicación, así un herbicida no selectivo se puede aplicar de tal manera que llegue a las malezas pero no al cultivo (Ware, 2004).

Por su forma de uso, se dividen en “herbicidas de contacto” cuando se aplican al follaje y afectan solamente la parte tratada, mientras que aquellos que se trasladan del follaje tratado hacia un punto de acción en otro lugar de la planta se denominan “sistémicos”. Adicionalmente se pueden clasificar en “herbicidas residuales” cuando la aplicación es al suelo desde donde tienen que persistir por algún tiempo para afectar la germinación de las malezas, sin importar si tienen

acción de contacto, afectando a las raíces y a los tallos en la medida en que emergen de la semilla, o si entran en la raíz, las partes subterráneas de la planta y se distribuyen hasta su punto de acción (Caseley, 1996).

Por sus características químicas los herbicidas se dividen en:

1.2.1 Herbicidas Inorgánicos

Los primeros productos químicos usados para control de malezas eran compuestos inorgánicos. Durante el siglo XIX se utilizó por primera vez el sulfato de cobre para el control de malezas de hoja ancha, desde entonces los herbicidas se han utilizado cada vez más profusamente. De 1906 a 1960, las soluciones de arsenito de sodio eran las más comercializadas, posteriormente se utilizó el trióxido de arsénico. Los herbicidas inorgánicos han caído en desuso debido a que tienen poca selectividad, poca eficiencia y una gran toxicidad en humanos y otros animales, además de ser difícil determinar la concentración necesaria para acabar con la maleza (Ware, 2004).

1.2.2 Herbicidas Orgánicos

La clasificación de los productos orgánicos es bastante compleja debido a su gran variedad de estructuras químicas y la multitud de mecanismos de acción. La clasificación propuesta por la Sociedad de Ciencias de la Maleza, en los Estados Unidos de Norteamérica se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los productos orgánicos propuesta por la sociedad de ciencias de la maleza (Caseley, 1996).

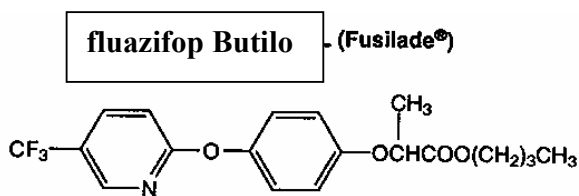
Amidas.	Inhibidores de la fotosíntesis e inhibidores de la reacción de Hill.
Ácidos benzóicos.	Están clasificados como análogos de las hormonas de crecimiento, y se cree que su modo de acción es la interferencia de la síntesis de proteínas.
Benzotiadiazoles.	Inhiben la fotosíntesis, aunque en forma muy limitada.
Bipiridilos.	Se disocian. El ion positivo, causa la ruptura de las membranas de las células y de los cloroplastos por estrés oxidativo.
Carbamatos.	Inhiben la división celular y el crecimiento de los tejidos. Inhiben la producción de proteínas y promueven el acortamiento de los telómeros de los cromosomas.
Ácidos Carboxílicos.	Herbicidas hormonales, análogos del ácido indolacético.
Ciclohexanodionas.	Inhibidores de la acetil co-enzima A carboxilasa (ACCase).
Dinitroanilinas.	Tienen un complejo modo de acción, el cual incluye la inhibición de varias enzimas del desarrollo y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.
Dinitrofenoles.	Desacoplan la fosforilación oxidativa.
Difenil Éteres.	Inhiben el transporte de electrones y desacoplan la fotofosforilación oxidativa. Son análogos de las auxinas y de los herbicidas fenoxi.
Imidazolinonas.	Inhiben la biosíntesis de aminoácidos.

Nitrilos.	Inhiben del crecimiento de plántulas, la fosforilación oxidativa e impiden la fijación de CO ₂ .
Fenoxi.	Afectan la división celular al bloquear el metabolismo del fosfato, así como el de los ácidos nucleicos.
Fosfono Aminoácidos.	Interfieren en la síntesis de los aminoácidos.
Fenil-carbamatos.	Inhiben la fotosíntesis al unirse a la proteína D1 del fotosistema II en la membrana de los tilacoides de los cloroplastos.
Ácidos ftálicos.	Inhiben la biosíntesis de proteínas, lípidos y la mitosis probablemente al afectar la formación de las paredes de la célula y el arreglo de los microtúbulos en los fragmoplastos celulares.
Piridazinonas.	Inhiben al sitio A del Fotosistema II, en consecuencia la fotosíntesis.
Piridina.	Inhiben la mitosis al final de la prometafase, produciendo mitosis tripolar. Se ligan a la proteína asociada con los microtúbulos. impidiendo la formación del huso mitótico.
Sulfonilúreas.	Inhiben la división celular de las radículas, por la inhibición de la acetolactasa sintetasa.
Tiocarbamatos.	Inhiben la biosíntesis de los ácidos grasos, proteínas, isoprenoides, y flavonoides.
Triazinas.	Las triazinas son fuertes inhibidores del transporte de electrones. El mecanismo de acción es el bloqueo de la fotosíntesis, en el sitio A del Fotosistema II.

Triazinonas.	Bloquean el transporte de electrones de QA a QB. Deteniendo la fijación de CO ₂ y la producción de ATP y NADPH+H.
Triazolopirimidinas.	Su modo de acción es similar al de las sulfonilureas y las imidazolinonas.
Uracilos.	Inhiben la fotosíntesis al bloquear la reacción de Hill, como sucede con las ureas y las triazinas.
Ureas.	Su mecanismo de acción es la inhibición de la fotosíntesis, la producción de los azúcares de la planta.
Ariloxifenoxi propionatos. (antes Ésteres Ácidos Oxifenoxi)	Inhibidores de la acetil co-enzima carboxilasa A (ACCase) e inhibidores por analogía de las auxinas.

1.2.3 Fenoxaprop-Etil.

Los Ariloxifenoxi propionatos son una de las clases más recientes de herbicidas,

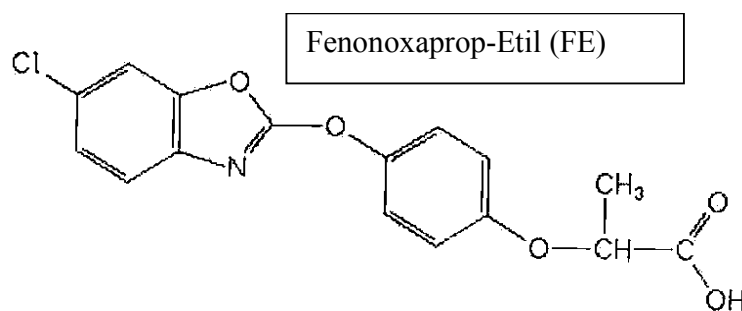


Propionato de 2-butil(4-(5trifluorometil-2-piridiloxil)fenoxi)

de uso postemergente de alta actividad contra pastos, a bajo costo. Estos compuestos son rápidamente translocados de los puntos de aplicación a los meristemas en crecimiento. Dentro de sus miembros se encuentra: el

fenoxaprop-etil (Whip®, Acclaim®), pertenecen a este grupo además, Fluazifop-butilo (ver fórmula) (Fusilade®), haloxifop-metilo (Verdict®, Gallant®), diclofop metilo (Hoelon®) y quizalofop-etilo (Assure®). Son inhibidores de la biosíntesis de los ácidos grasos y funcionan como inhibidores de las auxinas (Ware, 2004). A nivel celular son inhibidores de la acetil coenzima carboxilasa A (ACCase).

En el caso específico del Fenoxaprop-etil (FE) o ácido propanoico de (rs) 2 [4- (6-cloro -1,3-benzoxazol- 2-iloxil) fenoxilo; ver fórmula) es del tipo arilfenoxi propionato, se utiliza como herbicida de emergencia



ácido propanoico de (rs) 2 [4- (6-cloro -1,3benzoxazol- 2-iloxil) fenoxilo)

en el control de pastos indeseables, su modo de acción es por contacto foliar y sistémico. Se absorbe por hojas y se moviliza tanto acro como basopetalmente. La acción se localiza en los centros de crecimiento, donde afecta a los meristemas de la base foliar, las raíces y las yemas subterráneas. El principal sitio de acción bioquímica es la inhibición de la ACCasa que participa en la biosíntesis de lípidos en las especies gramíneas susceptibles (Caseley, 1996).

1.3 TOXICIDAD DE LOS HERBICIDAS.

Debido al éxito que significó la utilización de los herbicidas en el rendimiento de los cultivos, se ha intensificado la investigación y la producción de nuevas generaciones de estos productos. Sin embargo, aunque estas sustancias son diseñadas específicamente para bloquear funciones o rutas metabólicas de las plantas, la mayoría han mostrado tener efecto en humanos, ya sea mediante su exposición directa o por el consumo de productos alimenticios vegetales tratados o por el de productos de animales alimentados con los cultivos expuestos a los herbicidas (Caseley, 1996).

Antes de que un nuevo herbicida pueda comercializarse masivamente, tienen que proporcionarse datos que demuestren que su manipulación es segura para el operador y los consumidores de los cultivos tratados. Para lograr este propósito existen una serie de reglamentaciones e instituciones que verifican que estas se cumplan. Por ejemplo, “la administración de drogas y alimentos” (FDA) es la institución responsable de cumplir este propósito en los Estados Unidos de

Norteamérica y en conjunto con otras oficinas gubernamentales como la “agencia de protección al medio ambiente (EPA) controlan la veracidad de los estudios de bioseguridad proporcionados por los fabricantes y al mismo tiempo establecen normas que regulan el tipo y la cantidad de químicos permitidos en un cierto ambiente. Para este fin se recaba información de diferentes ámbitos de la toxicología, sobre emergencias médicas, epidemiológicas e información obtenida de experimentos relacionados con sustancias tóxicas (Klaassen, 2001).

La información mas común obtenida de los experimentos con animales expuestos a tóxicos se denomina “toxicidad relativa”. Se puede comparar la toxicidad de diversas sustancias usando la “dosis letal 50” (DL_{50}) oral o dérmica, en administración aguda y se define como la dosis o cantidad del químico que puede producir la muerte del 50% de los animales tratados. Sin embargo es ampliamente aceptado que esta forma de evaluación presenta limitaciones, porque no refleja todos los posibles efectos asociados a la exposición de un fármaco (Klaassen, 2001).

Dado que la toxicidad de los herbicidas está influenciada por una serie de factores: el efecto fisiológico o la ruta metabólica blanco de la sustancia, la dosis administrada, la velocidad de absorción, la velocidad de degradación del compuesto, el tiempo de exposición, la susceptibilidad, etc. se han diseñado metodologías que permitan determinar efectos más sutiles sobre las funciones celulares a dosis inferiores a la CL_{50} o subletales de los herbicidas, que han permitido encontrar efectos sobre funciones de diversos sistemas como el reproductor (Bretveld y cols., 2006).

1.4 REPROTOXICIDAD.

Los plaguicidas afectan una gran variedad de eventos fisiológicos en los organismos y sus mecanismos son tan variados como la cantidad de compuestos existentes. Algunos plaguicidas pueden interferir con la función hormonal, afectando o interrumpiendo el balance necesario, para el apropiado funcionamiento del sistema reproductivo en diversas especies. En algunos experimentos se ha demostrado que los plaguicidas interactúan con los receptores de estrógenos y/o andrógenos afectando el ciclo ovárico o la gametogénesis (Klaassen, 2001; Bretveld y cols., 2006).

Los plaguicidas tienen otros efectos sobre la fisiología reproductiva y pueden afectar a los organismos en varios niveles: i) la síntesis de novo de hormonas, ii) su almacenamiento y liberación, iii) su transporte y clarificación en el hígado, iv) la unión al receptor, v) función tiroidea y vi) el sistema nervioso central (Bretveld y cols., 2006).

Aunque la FAO considera que en general los herbicidas tienen baja toxicidad debido a que sus DL_{50} son altas, algunos, como la atrazina, han mostrado una gran cantidad de efectos tóxicos en dosis inferiores a su DL_{50} (Hayes, 2002). Estos estudios se realizan desde la óptica de la toxicología reproductiva, que estudia los efectos producidos por agentes exógenos (xenobióticos) en la reproducción. Los xenobióticos incluyen agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos y físicos, que pueden afectar el ciclo reproductivo o el desarrollo de los organismos y disminuir su fertilidad (Bonilla y cols., 2001).

Durante los últimos años se han observado alteraciones en la salud reproductiva humana, lo que suscitó preocupación. Algunos estudios revelan que una de cada cinco parejas es involuntariamente infértil (Nunziata, 1998), la organización mundial de la salud (OMS) reporta como causas principales de infertilidad al factor tubárico, que incluye a la endometriosis en el 42% de los casos y a los trastornos ovulatorios en el 33% (Rowe y cols., 1993). Otros autores reportan números similares e incluyen al factor masculino con anomalías espermáticas con un

40% y por último indeterminación de la causa condicionante de la infertilidad en 5% (Hull y cols., 1985). En México existe pocos estudios sobre la infertilidad, Ramírez y colaboradores (1989) reportan en humanos al factor endocrino-ovárico alterado en 35% de los casos que se reflejan en el síndrome de ovario poliquístico que es la alteración más frecuente, seguido del factor tuboperitoneal en 28% y consideran al factor masculino en 26%. Los estudios epidemiológicos realizados en el país son escasos y no son concluyentes debido a que el tamaño de muestra es muy pequeño, por lo que impiden ofrecer conclusiones firmes de la tendencia en tasas de infertilidad. Además de la escasez de información, en el país existen limitaciones sociales para conocer con precisión el número de parejas afectadas por la infertilidad, por lo que los valores atribuidos al factor masculino pueden aumentar (Rowe y cols., 1993). Adicionalmente se ha observado que en el hombre la concentración de espermatozoides en el eyaculado ha disminuido en los últimos 50 años de 113 a 66×10^6 espermatozoides por ml (Carlsen y cols., 1992).

En general hay evidencia de que la infertilidad está asociada con el estilo de vida, la tendencia a posponer los embarazos en edades avanzadas, uso de métodos anticonceptivos hormonales, aumento en la incidencia de enfermedades de transmisión sexual, dietas, ejercicios extenuantes y el incremento en la exposición a agentes ambientales potencialmente reprotóxicos (Vargas y cols., 2005; Skakkebaek y cols., 2006). Actualmente nos encontramos expuestos a más de 100 000 productos químicos de uso comercial y se estima que se generan entre 700 y 1000 productos nuevos al año (Nunziata, 1998). Debido a esto, se ha dado un gran auge al desarrollo de estudios que permitan evaluar la toxicidad de estos agentes en la reproducción (Pflieger-Bruss y cols., 2004).

El estudio de los riesgos por exposición a compuestos químicos se dificulta debido a que existen diferentes momentos y niveles en los cuales estos compuestos pueden afectar al sistema reproductor, aunque existen diversos períodos en los cuales el organismo es más susceptible (Klaassen, 2001).

El primero de los períodos es el desarrollo gonadal. En los mamíferos el sexo gonadal es determinado cromosómicamente, el cromosoma Y es el responsable

de la determinación sexual gonadal. La gónada masculina indiferenciada produce dos diferentes tipos de hormonas, el factor inhibidor de los conductos mullerianos y la testosterona. Los procesos de diferenciación testicular se pueden interrumpir debido a que es un proceso dependiente de estas hormonas y a que algunas poblaciones celulares clave son sensibles a la intromisión de xenobióticos que toman el lugar de estas hormonas (Klaassen, 2001; Bretveld y cols., 2006).

El segundo período es la etapa posnatal y prejuvenil en donde el desarrollo de las células germinales es de vital importancia. En el caso de los machos durante esta etapa se inicia la formación de la primera generación de espermatogonias A. La evidencia demuestra que las células de Sertoli generan las señales responsables del adecuado desarrollo de las células germinales. Si por algún “insulto” estas células se ven disminuidas, la espermatogénesis se ve reducida o se interrumpe definitivamente.

El tercer período es en la etapa adulta, durante este proceso existe también regulación hormonal mediante las células de Sertoli y Leydig, las cuales, son susceptibles de “insulto”, sin embargo en este caso la regulación tiene un componente del sistema nervioso central (Klaassen, 2001).

La toxicidad reproductiva implica afectaciones a moléculas clave de todos estos períodos, así como a mecanismos que afectan la integridad del epitelio seminífero, y a las células que soportan la espermatogénesis y la maduración espermática epididimaria (Mantovani y Maranghi, 2005). Existe además la posibilidad de que los xenobióticos afecten la fertilidad en el espermatozoide diferenciado, que puede perder su capacidad fertilizante por diversos motivos como alteraciones en la capacitación espermática.

1.5 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.

Al concluir la morfogénesis del espermatozoide, éste es liberado del epitelio seminífero a la luz del túbulo en un proceso denominado espermiación. Desde ahí migra hacia la cabeza, luego al cuerpo y finalmente a la cola del epidídimo;

durante este paso el espermatozoide madura incorporando factores proteínicos a su membrana que le permitirán un posterior reconocimiento del ovocito. Una vez terminada su maduración en el epidídimo, aún se encuentra parcialmente descapacitado, parcialmente inmóvil e incapaz de fertilizar al ovocito, por lo que deberá pasar por el proceso de capacitación. El descubrimiento del proceso de capacitación se llevó a cabo cuando se intentó la fertilización *in vitro* de ovocitos con espermatozoides recién eyaculados. Los espermatozoides de conejo recién eyaculados o colectados en las vías deferentes eran incapaces de fertilizar ovocitos en el oviducto, mientras que los que habían sido expuestos al oviducto de donadoras durante 4 y 8 horas sí eran capaces de hacerlo (Noyes, 1953).

Aunque se sabe que la capacitación *in vivo* se realiza gracias a las características del tracto reproductor femenino, no se conocen con certeza los factores que controlan directamente la capacitación del espermatozoide en dicho tracto. Históricamente se han sugerido una variedad de sustancias posibles, entre las que se encuentran enzimas, glicosaminoglicanos y catecolaminas, además se le ha atribuido efecto al cérvix y su moco; también se ha concedido gran importancia a los estrógenos femeninos y la progesterona (Belsey y cols., 1980). Actualmente se ha profundizado más en el conocimiento de este fenómeno y aunque se sigue investigando no se ha identificado ningún factor único a quien atribuirle el fenómeno.

1.6 CAMBIOS CELULARES OBSERVADOS EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.

1.6.1 Movilidad espermática.

Es considerada como uno de los factores más importantes en el proceso de fertilización ya que participa tanto en el transporte de los espermatozoides hacia el ámpula de la trompa de Falopio, como en la interacción con la zona pelúcida y proporciona la fuerza de empuje que le permite atravesarla previamente a la fusión de su membrana con la del ovocito (Burkin y Miller, 2000; Naz y Rajesh, 2004).

El primer cambio en la movilidad espermática es la hiperactivación, en donde se observa una modificación en la actividad del flagelo (Yanagimachi, 1994). En la hiperactivación, se ha demostrado una elevación en las concentraciones intracelulares de adenosin monofostato cíclico (AMPC) y de calcio, asociadas con la disminución del pH intracelular (White y Aitken, 1989; Reyes, 1994); tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* este cambio se atribuyó a la eliminación del plasma seminal.

Posterior a la hiperactivación, la movilidad se torna sincronizada y unidireccional, además se ha demostrado que el patrón de movilidad hacia el frente se presenta preferentemente en espermatozoides con morfología normal (Morales y cols., 1988).

1.6.2 Cambios en la superficie durante la capacitación espermática.

Chang (1984) mostró que el espermatozoide es descapacitado por componentes del líquido seminal, los cuales se depositan sobre su superficie durante su paso por el tracto reproductor masculino y que los fluidos del tracto reproductor femenino modifican los componentes de la superficie espermática, lo que demuestra una estructuración dinámica de la membrana capaz de responder a las señales ambientales específicas. Lo anterior puede evidenciarse con la utilización de anticuerpos monoclonales, los espermatozoides expuestos a condiciones capacitantes presentan migración de antígenos de superficie de la parte posterior del flagelo, hacia la parte anterior del mismo, (Myles y Primacoff, 1985).

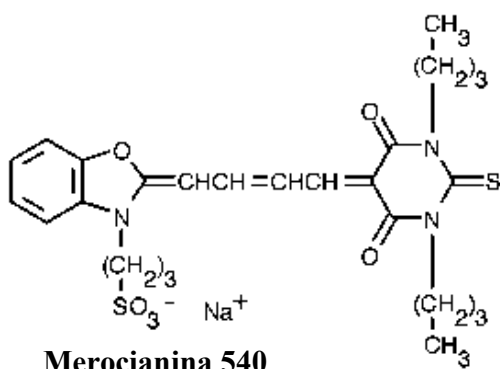
La superficie externa de la cabeza del espermatozoide es una región de suma importancia para el reconocimiento de los gametos, existe evidencia de que previo a su fusión, hay cambios en la composición y orientación de carbohidratos, glicoproteínas y lípidos (White y cols., 2000; Brewis y cols., 2005a; Zayas y cols., 2005). Durante estos cambios existe la remoción de glicoproteínas periféricas y la redistribución de glicoproteínas integrales y de fosfolípidos, así como una disminución del colesterol (Knobil y Neill, 1994; Flesch y cols., 2001). Entre las modificaciones de la membrana durante la capacitación, se han estudiado también

la distribución y composición de carbohidratos (Domino y cols., 2001). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de las lectinas WGA y Con-A por citometría de flujo (CF) y microscopia de fluorescencia, observándose cambios en la composición de carbohidratos específicos de reconocimiento (Jiménez y cols., 2002).

Aunque no se ha descartado que los procesos que acompañan a la capacitación impliquen la eliminación de los factores descapacitantes en la superficie espermática, desestabilizando la membrana plasmática y favoreciendo la interacción con la membrana acrosomal externa (Díaz y cols., 1994; Kawakami y cols., 2004), recientemente, se ha propuesto que este posible mecanismo de la capacitación, se complementa con el efecto inductor que tiene el bicarbonato, presente en el tracto reproductor femenino, el cual penetra con mayor facilidad a la célula al disminuir la concentración del colesterol en la membrana plasmática. Este proceso, activa a la adenilato ciclasa, que consecuentemente eleva la concentración de AMPc, que por un lado, activa a la fosfoquinasa A (PKA), lo que desencadena una serie de fosforilaciones de otras proteínas de membrana y flagelo espermáticos y por el otro activa una “escramblasa” que promueve el desorden de los fosfolípidos exteriorizando a la fosfatidilserina que antes sólo se encontraba en la cara interna de la membrana plasmática del espermatozoide (Flesch y cols., 2001).

La disminución del colesterol en la membrana, debida a su secuestro mediante

moléculas acarreadoras en el tracto reproductor femenino, se suma al mencionado fenómeno de desorganización de los fosfolípidos (Flesch y cols., 2001). Mientras que las fosforilaciones sucesivas alcanzan a la dineína la cual inicia y mantiene la hiperactivación espermática



El proceso de activación celular (la capacitación) promueve un aumento en la fluidez de la membrana que se puede monitorear con merocianina 540 (M540) (ver fórmula), un cromóforo heterocíclico con una carga negativa que se une paulatinamente a la cara externa de la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares, conforme se van generando los dominios libres de colesterol y con un nivel relativamente bajo de empaquetamiento de ácidos grasos (Flesch y cols., 2001; Rathi y cols., 2001; Nagy y cols., 2003; Hernández y cols., 2005).

1.7 CITOMETRIA DE FLUJO.

La CF es un método analítico que mide la dispersión y la emisión de luz de partículas microscópicas, generalmente células, inducida por una iluminación apropiada. En el equipo estas partículas microscópicas desfilan de una en una por una cámara de trabajo que corre frente a un sistema de detección.

La CF aprovecha el desarrollo de moléculas fluorescentes diseñadas para acumularse en compartimientos celulares, o adosadas a anticuerpos específicos para detectar y cuantificar estructuras o funciones celulares individuales. Los estudios se pueden realizar a una velocidad elevada y se analiza un alto número de células.

La información generada por el citómetro de flujo sobre el tamaño de la partícula (Forward light scatter, FSC), la complejidad (SSC) y las fluorescencias (FL) son guardadas en una base de datos del sistema de cómputo para su posterior análisis con herramientas específicas.

La CF tiene múltiples aplicaciones, permite identificar células y determinar sus propiedades fisiológicas, se utiliza ampliamente en la clínica y en la investigación. En los años 90's se empezó a utilizar en la determinación de daño a las células por exposición a diferentes tóxicos y específicamente para determinar la integridad de los espermatozoides utilizados en las clínicas de fertilidad (Evenson y cols., 1999; Spano y cols., 2000).

1.8 ANALISIS DE LA VIABILIDAD.

La viabilidad es un parámetro que permite determinar el estado que guarda una muestra, previo a los análisis de cualquier tipo celular. En el estudio de los espermatozoides este parámetro adquiere una mayor importancia porque ayuda, en conjunto con otras características a establecer la fertilidad de un organismo (OMS, 1990).

Es necesaria la evaluación de la viabilidad espermática durante los ensayos, pues permite discriminar la sensibilidad de la muestra a los tratamientos y aún los errores en la manipulación de la muestra.

La forma tradicional de evaluar la viabilidad en las muestras espermáticas es mediante la tinción con colorantes vitales, como la tinción con Eosina y Nigrosina (EN). Este método se basa en las diferencias en la permeabilidad a algunas sustancias por parte de la membrana plasmática de los espermatozoides vivos, por esto solo los que se encuentren muertos son positivos a la tinción. La Eosina es un colorante que se une específicamente a las proteínas y tiene un color rosado característico, mientras que la nigrosina es un colorante poco soluble y que sirve para dar contraste a las células. La tinción da como resultado dos patrones, uno para vivos sin coloración y otro para muertos con la cabeza del espermatozoide teñida de rosa (OMS, 1990).

Existen otras metodologías, con el mismo fundamento, para evaluar la viabilidad espermática, como es el caso de la tinción de las células con yoduro de propidio (IP) y su evaluación con el citómetro de flujo.

El IP es un cromóforo que se intercala de forma estequiométrica, a razón de una molécula entre 4 y 5 pares de bases de ácido desoxiribonucleico (DNA) o bases de ácido ribonucleico (RNA) y que florece a un máximo de 617nm (rojo) cuando es excitada por un haz de luz. Además las membranas plasmáticas de las células vivas son impermeables al colorante, por lo que solo las muertas serán positivas a la tinción (Molecular Probes, 1999).

2 ANTECEDENTES.

Desde el trabajo de Guillete (1994) donde demostró el daño testicular y de la feminización de lagartos (*Alligator mississippiensis*) expuestos a DDT, por un derrame accidental en el lago Apopka en Florida, EUA, se comenzó a tomar conciencia del riesgo que representa la exposición ambiental a plaguicidas sobre la salud reproductiva y se han acumulado evidencias sobre el efecto de estos compuestos en el aparato reproductor y se ha profundizado en los mecanismos específicos de cada una de las sustancias.

En algunos países la agricultura sería impensable sin el uso de estos compuestos, pero su uso reiterado ha propiciado su acumulación en algunos ambientes (Caseley, 1996).

Debido a las limitaciones para establecer los efectos específicos de un herbicida sobre las diferentes funciones de un organismo, se buscan modelos de estudio. La información más frecuente para evaluar el riesgo reproductivo, se obtiene de los estudios con animales silvestres y de experimentación, por reportes de incidentes clínicos, estudios epidemiológicos en personas ocupacionalmente expuestas y de ensayos *in vitro* (Klaassen, 2001).

En el caso específico del FE, se sabe que tiene una DL_{50} oral aguda para rata: 2090-3040 mg/Kg, una DL_{50} oral aguda para ratón: > 5000 mg/Kg, una DL_{50} dérmica aguda para rata: > 2000 mg/Kg. Y una CL_{50} inhalatoria aguda en rata: >0,604 mg/L, por lo que se considera con una toxicidad media (Bayer 2006), y no cuenta con reportes de riesgo toxicológico.

Sin embargo, en estudios *in vivo* algunos herbicidas han mostrado tener efectos indeseables sobre la reproducción, como la atrazina, que en ratones macho a una dosis de 120 mg/kg administrada durante 7 días, incrementó el peso de la próstata y la hipófisis (Simic y cols., 1994). En renacuajos machos de *Xenopus laevis* indujo hermafroditismo y desmasculinización de la laringe; planteándose la

hipótesis de que la atrazina induce la actividad de aromatasa, lo que promueve la producción de estrógenos a partir de la testosterona (Hayes, 2002).

Desde hace algunos años numerosos autores han reportado una disminución en la calidad del semen en hombres que habitan en áreas agrícolas comparadas con los habitantes de algunas ciudades (Nelson y Bunge, 1974; Carlsen y cols., 1992; Swan y cols., 1997). Fenómeno que se ha observado en estudios más recientes y que confirman la disminución en la calidad del semen (Swan y cols., 2003a). Entre los parámetros que se afectan mayormente en los individuos estudiados son la concentración, la morfología y la movilidad espermática, parámetros que se consideran en los estudios básicos de calidad de semen contemplados por la OMS (Swan y cols., 2003b).

Se ha planteado la hipótesis de que estas diferencias en la calidad de semen de los habitantes de áreas agrícolas se pueden atribuir a la exposición ocupacional a diversos plaguicidas en especial a algunos herbicidas como el ácido 2-4 dicloroacético, del cual se ha determinado que la disminución de la concentración espermática y aumento en diferencias en la morfología se correlacionan con los niveles del herbicida en orina (Lerda y Rizzi, 1991).

Se ha examinado la calidad del semen entre hombres fértiles e infértiles, sugiriendo una asociación entre los niveles de organoclorados en suero y un decremento en la movilidad, concentración espermática, así como el porcentaje de espermatozoides normales (Hauser y cols., 2002).

Existen estudios en donde se afirma que insecticidas organoclorados se encuentran presentes en el semen de humanos de forma proporcional a los niveles en plasma sanguíneo aunque en cantidades 40 veces menores (Magnusdottir y cols., 2005). Además, en este estudio se estableció que la presencia de los plaguicidas organoclorados no parece afectar los parámetros básicos de calidad del semen como la concentración espermática, la morfología y la viabilidad. Sin embargo, estos parámetros permiten evaluar la calidad de los espermatozoides de manera general y no consideran daños más sutiles pero

importantes, como: el daño al ADN (Evenson y cols., 1999; Spano y cols., 2000), daño a las membranas plasmáticas y a su potencial por estrés oxidativo (Garrido cols., 2004) a la capacitación y a la reacción acrosomal que pueden ser generados por la persistencia de reprotóxicos en el semen.

Aunque del herbicida FE no hay estudios sobre su toxicidad, compuestos similares se han reportado en animales y humanos como inhibidores de la ACCasa, disruptores del metabolismo de los ácidos grasos en hepatocitos e interfieren con el transporte de membrana en células musculares (Holtum y cols., 1991). Recientemente, dentro del grupo de trabajo, se reportó que el FE reduce la viabilidad y la motilidad *in vitro* de los espermatozoides en concentraciones de 50, 100 y 500 μM (Betancourt y cols., 2006).

3 JUSTIFICACIÓN.

La utilización de herbicidas ha demostrado conllevar riesgos de toxicidad reproductiva tanto en individuos expuestos como por el contacto indirecto a través del consumo de alimentos contaminados. Existen datos acerca del efecto de diversos herbicidas sobre los organismos, por ejemplo en personal ocupacionalmente expuesto, estudios epidemiológicos y en animales experimentales.

Los modelos *in vitro* permiten llevar a cabo estudios para explicar los posibles mecanismos de acción de los herbicidas sobre los gametos. En el caso específico del FE existen pocos datos sobre su toxicidad, en particular, en su actividad reprotóxica. En el grupo de investigación de Biología Celular de la UAM-I se ha demostrado que este herbicida inhibe la movilidad espermática *in vitro*, en espermatozoides no capacitados (Betancourt y cols., 2006), por lo que en el presente estudio se propone determinar el efecto del FE sobre la capacitación espermática *in vitro*, ya que este es un proceso necesario para que los espermatozoides adquieran la capacidad fertilizante.

4 HIPÓTESIS:

Modificaciones en la movilidad espermática han sido directamente atribuidas a cambios fisiológicos que se llevan a cabo al alcanzar la capacitación y se ha observado que la exposición de los espermatozoides a FE inhibe su movilidad,

Por lo tanto la exposición de los espermatozoides a concentraciones crecientes del herbicida FE afectará la capacitación espermática.

5 OBJETIVO GENERAL.

- Determinar el efecto del FE *in vitro* sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo evaluada por M540.

6 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Validar la técnica de viabilidad de espermatozoides por CF con IP, comparándola con resultados obtenidos con la técnica de EN.
- Descartar el efecto del solvente (etanol) del FE sobre la viabilidad y la capacitación de espermatozoides.
- Determinar el efecto de las concentraciones 50, 100, 200 y 300 μ M de FE sobre la viabilidad de espermatozoides.
- Determinar el efecto de las concentraciones 50, 100, 200 y 300 μ M de FE sobre la capacitación de espermatozoides por CF con M540.

7 MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA MUESTRA DE SEMEN.

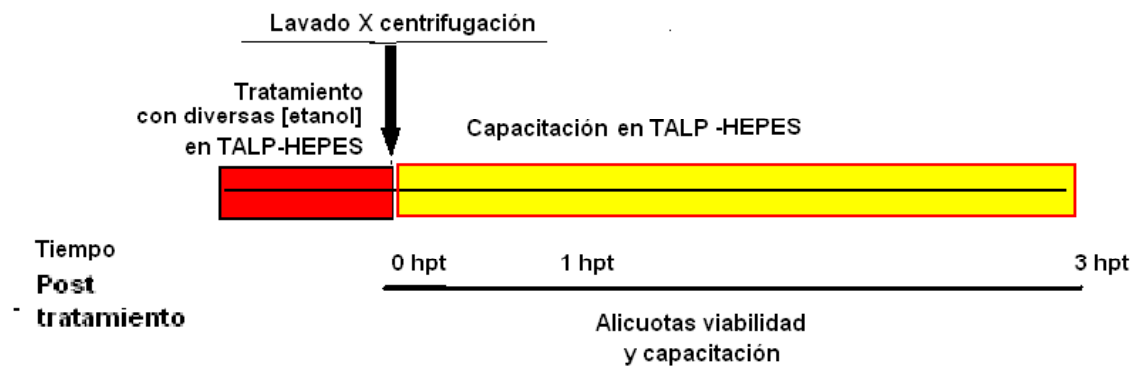
Las muestras de semen provinieron de una granja comercial. Los cerdos donantes tenían al menos tres días de abstinencia. La muestra se colectó 24 horas antes de los experimentos por el método de la mano enguantada. En cada ocasión se removió la fracción gelatinosa y se diluyó la fracción rica en espermatozoides en un medio conservador comercial y se mantuvo entre 15 a 20°C hasta su uso. Una vez en el laboratorio la muestra se lavó por centrifugación con solución salina de fosfatos (PBS) Se tomaron alícuotas directas y se analizaron por microscopia óptica a 400 aumentos para determinar la concentración celular, movilidad, anormalidades, viabilidad y capacitación espontánea. Para los ensayos posteriores se utilizaron muestras con una movilidad y viabilidad mayores al 80%, con anormalidades en menos del 15% de la población (Betancourt y cols., 2006) y un porcentaje de capacitación espontánea de entre 15 y 25%.

7.2 DILUCIÓN DE LA MUESTRA.

Las muestras de semen se lavaron dos veces con PBS y fueron sedimentadas por centrifugación a 600 x g por 5 min. Posteriormente la pastilla se resuspendió y diluyó a una concentración final de 50×10^6 espermatozoides /mL en medio TALP-HEPES para todos los tratamientos (Bavister, 1989). Se realizó el mismo procedimiento en las muestras de todos los ensayos.

7.3 ENSAYOS CON ETANOL.

Con objeto de descartar el efecto del etanol sobre la viabilidad espermática, previamente a los ensayos con el herbicida, se realizaron experimentos para determinar el efecto del solvente. Inicialmente se evaluó la concentración máxima (5% v/v), de la siguiente manera: de la muestra diluida como se describió previamente, se tomaron alícuotas con 50×10^6 células, se incubaron en medio



Diseño del ensayo para verificar el efecto del etanol sobre la viabilidad y capacitación. La línea roja corresponde a la hora de tratamiento de los espermatozoides con los diferentes porcentajes de etanol en TALP-Hepes sin suplementar. Posteriormente se lavaron y resuspendieron en medio TALP-HEPES adicionado con BSA y piruvato de sodio (condiciones capacitantes). Se tomaron alícuotas para su análisis a los 0, 1 y 3 horas posteriores al tratamiento (hpt).

TALP-HEPES, más 5% de etanol por una hora a 39°C en una atmósfera humidificada y 5% de CO₂. Posteriormente para eliminar el etanol, las muestras de semen fueron lavadas en dos ocasiones con PBS y sedimentadas por centrifugación a 600 x g por 5 min a 37°C. Posteriormente la pastilla fue resuspendida y diluida a la concentración final de 50×10^6 espermatozoides/mL en medio TALP-HEPES suplementado con 0.011 g/L y albúmina sérica bovina 0.3 g/L, a 39°C en una atmósfera humidificada y 5% de CO₂, para generar capacitación.

Posteriormente, se evaluó el efecto del etanol a concentraciones menores (0.5, 1, 2 y 3%), sobre la viabilidad y la capacitación espermática mediante CF utilizando IP para la viabilidad y M540 para la capacitación, para lo cual se procesaron como

se describió para etanol al 5%. Se utilizó como control una alícuota de la misma muestra con el mismo proceso de tratamiento pero sin etanol.

7.4 ENSAYOS DE CAPACITACIÓN.

Los espermatozoides tratados por una hora con las diferentes concentraciones de etanol ó FE se lavaron con PBS y se les indujo la capacitación resuspendiéndose en medio TALP-H suplementado con albúmina sérica bovina y piruvato, e incubándolos por 3h a 39°C en una atmósfera humidificada y 5% de CO₂. Se tomaron alícuotas de 400 µL a los 0, 1 y 3 h de incubación después de la hora de tratamiento, a los cuales se les denominó horas posteriores al tratamiento (hpt); 0hpt (espermatozoides tratados por una hora, lavados y resuspendidos en medio TALP-H suplementado e inmediatamente evaluados), 1 y 3 hpt respectivamente para la evaluación de la viabilidad y capacitación.

7.5 CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD:

La viabilidad se cuantificó por CF con la tinción de IP. Previamente se validó esta técnica comparándola con la técnica tradicional, realizada con el microscopio óptico mediante la tinción con EN. Se realizaron cinco ensayos independientes. No se encontraron diferencias entre ambos métodos por lo que se optó por realizar sólo el análisis citométrico para los ensayos con FE.

7.5.1 Tinción con Eosina-Nigrosina.

Se colocó una gota del colorante de EN (apéndice 1) y una gota de la muestra de espermatozoides previamente lavados en un extremo de un portaobjetos. Se preparó el frotis mezclando y deslizando con otro portaobjetos, se dejó secar por 10 min para fijar el colorante y se observó en microscopio óptico a 400 aumentos.

Se consideraron como espermatozoides muertos los que mostraban la cabeza teñida con una coloración rosada y vivos aquellos que se mostraron translucidos. Se analizaron 100 células por muestra.

7.5.2 Análisis de viabilidad con IP.

Para el análisis de la viabilidad con el citómetro de flujo se empleó un citómetro FACScan de Becton-Dickinson. Se cuantificaron las células viables con base en la tinción de los ácidos nucleicos con IP (apéndice 1) en las alícuotas de 400 μ L de las células incubadas en condiciones capacitantes; se analizaron en los siguientes cinco minutos.

El fluorocromo IP se detecta como fluorescencia 3 (FL3). Se adquirieron al menos 10,000 eventos (Nagy y cols., 2003) que se almacenaron en el sistema de computo del equipo como una base de datos que se analizó con el programa WinMDI.

En el programa mencionado se seleccionó la región donde se encontraban principalmente los espermatozoides, a partir de la cual se le pidió al programa que cuantificara los espermatozoides positivos a la tinción con IP, ubicando la región de los espermatozoides negativos con un blanco de espermatozoides no teñidos, con el fin de eliminar la autofluorescencia previa al análisis.

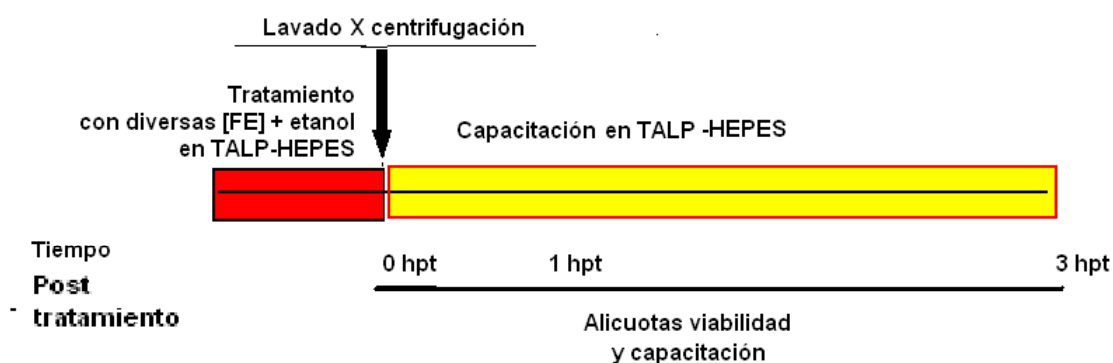
7.6 CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACITACIÓN:

Para evaluar la capacitación, la muestra fue procesada de la forma descrita anteriormente y sometida a los tratamientos. Se tomaron alícuotas de 400 μ L de la suspensión de espermatozoides a las que se les adicionó el fluorógeno hidrofóbico M540 (Apendice1) (Rathi y cols., 2001) 10 min antes del ensayo. Se analizaron en el CF FACScan. La fluorescencia de la M540 se detectó como FL2. Se adquirieron 10,000 eventos a velocidad alta y los resultados se almacenaron en una base de datos que se analizó con el programa WinMDI.

En el programa se utilizó la misma región donde se encontraban principalmente los espermatozoides, a partir de la cual se le pidió al programa que cuantificara a los positivos a la tinción con M540, ubicando la región de los espermatozoides negativos con base en un valle característico, durante las primeras horas de incubación.

7.7 TRATAMIENTO CON EL HERBICIDA FENOXAPROP-ETIL (FE).

Se preparó una solución concentrada de FE 10 mM grado técnico (Aventis Cropscience, México) diluida en etanol absoluto. A partir de ésta se adicionó el



Diseño del ensayo para verificar el efecto del FE sobre la viabilidad y capacitación. La línea roja corresponde a la hora de tratamiento de los espermatozoides con los diferentes concentraciones de FE en medio TALP-Hepes sin suplementar. Posteriormente se lavaron y resuspendieron en medio TALP-HEPES adicionado con BSA y piruvato de sodio (condiciones capacitantes). Se tomaron alícuotas para su análisis a los 0, 1 y 3 horas posteriores al tratamiento (hpt).

volumen necesario para alcanzar las concentraciones. Se prepararon diluciones de FE 0, 50, 100 y 500 μM en 1.5 ml de medio TALP-HEPES, cada dilución contenía una concentración final de etanol de 0.5, 1, 2, 3 y 5% respectivamente (Betancourt y cols., 2006). Los espermatozoides se expusieron a las diferentes concentraciones de FE por 60 minutos, se lavaron con PBS y se capacitaban como se describió previamente. Se utilizó como control una muestra con el mismo proceso pero tratadas con 0 μM de FE. Posteriormente se analizó la viabilidad y la

capacitación usando IP y M540 respectivamente, en el citómetro de flujo FACScan, las muestras se analizaron como se detalla en los apartados correspondientes.

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se recopilaron los resultados de viabilidad y capacitación de los ensayos realizados para evaluar el efecto de cada una de las concentraciones de etanol o FE, y se compararon con su control en cada uno de los tiempos evaluados. Debido a que los datos son ordinales, se compararon mediante la prueba estadística no paramétrica U de Mann-whitney que implica el análisis de todos los datos y no una medida de tendencia central. El nivel de confianza fue de $p < 0.05$.

La presentación de los resultados se ilustra con gráficas denominadas de barras y bigotes. En donde la barra horizontal que se encuentra dentro de la caja, corresponde a la mediana de la muestra, la caja incluye el percentil 75 y las barras horizontales externas incluyen el percentil 95.

8 RESULTADOS

8.1 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE CF CON IP RESPECTO DE LA MICROSCÓPICA, USANDO EOSINA-NIGROSINA.

Se validó la técnica de análisis de la viabilidad para espermatozoides no tratados por medio de CF con IP, respecto de la técnica convencional con EN a través del microscopio óptico. Se emplearon espermatozoides conservados por 24 h en un diluyente comercial. Se transportaron al laboratorio a una temperatura de 15°C en donde se evaluó la concentración espermática no menor a $50 \times 10^6/\text{mL}$, la morfología y la movilidad aparente. Se les indujo la capacitación incubando en medio TALP-HEPES suplementado con albúmina sérica bovina y piruvato de sodio, inmediatamente después de ser llevados al laboratorio, evaluados y lavados (espermatozoides no tratados). Se realizaron cinco ensayos independientes, de los que se fueron tomando alícuotas a las que se les evaluó la viabilidad a los 0, 60 180 minutos con cada uno de los métodos citados (Figura 1 y Cuadro 1).

Los resultados obtenidos por CF con IP, para cada tiempo de exposición al medio capacitante se compararon con los que se obtuvieron por microscopía óptica con EN con la prueba de U de Mann-Whitney, la cual no mostró diferencia significativa entre ambas metodologías ($p > 0.05$) (Figura 1).

En todos los ensayos hubo una disminución gradual de la viabilidad con respecto al tiempo de exposición al medio de capacitación, independientemente del método con que se evaluó la viabilidad (Figura 1). Ya que no hubo diferencias entre las dos metodologías en cuanto a los valores de viabilidad, se optó por utilizar la técnica de IP para cuantificar la viabilidad.

	% de viabilidad con IP			% de viabilidad con EN		
	0	60	240	0	60	240
Tiempo en minutos	0	60	240	0	60	240
Valores Extremos	92-72	90-62	84-54	92-70	85-45	79-43
medianas	86	79	67	88	77	63

Cuadro 1.- Medianas valores extremos del porcentaje de la viabilidad de los espermatozoides sometidos a capacitación durante 0, 60 y 240 min evaluados con IP por citometría de flujo, y con EN por microscopía óptica. Se contrastaron los resultados obtenidos con ambas metodologías en cada uno de los tiempos con la prueba de U de Mann-Whitney, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). En todos los ensayos se nota una disminución gradual de la viabilidad con respecto al tiempo de exposición al medio de capacitación independientemente de la metodología usada. $n=5$ ensayos.

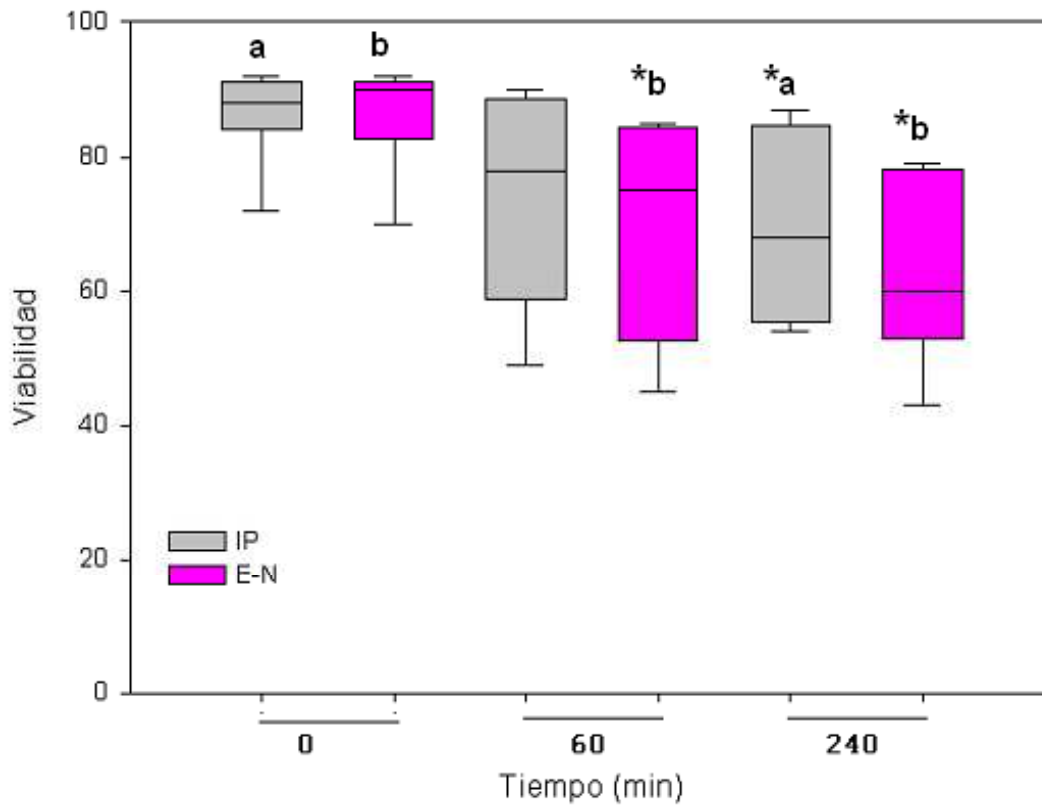


Figura 1. Los resultados de la cuantificación de la viabilidad de espermatozoides sometidos a capacitación por 0, 60 y 240 min evaluados con IP (a) por citometría de flujo, y con EN (b) por microscopía óptica, para cada tiempo de exposición al medio capacitante. Se compararon los resultados obtenidos con ambas metodologías en cada uno de los tiempos (a con b) con la prueba de U de Mann-Whitney, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). En todos los ensayos hubo una disminución gradual de la viabilidad con respecto al control a lo largo del tiempo de exposición al medio de capacitación, independientemente de la metodología usada, aunque con la técnica de EN la diferencia es significativa a los 60 y 240 minutos (*b) de capacitación mientras que con IP solo se observa a 240 minutos (*a) ($p < 0.05$).

8.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CAPACITACIÓN EVALUADA CON M540 Y VIABILIDAD EVALUADA CON YODURO DE PROPIDIO (IP).

Con el fin de estandarizar la técnica citométrica de capacitación, una muestra se sometió a capacitación y se evaluó el porcentaje de espermatozoides positivos a la tinción. Se emplearon espermatozoides conservados que se analizaron y procesaron como se menciona en la sección 8.1 para espermatozoides no tratados. La capacitación se indujo mediante su incubación en medio TALP-HEPES suplementado con albúmina sérica bovina y piruvato. La cuantificación se realizó evaluando alícuotas obtenidas a los 0, 60 y 240 minutos por CF con la adición de M540. Se realizaron 3 ensayos independientes. Adicionalmente en los mismos ensayos donde se evaluó la capacitación se tomaron otras alícuotas a los mismos tiempos para cuantificar el porcentaje de viabilidad por CF.

Se observó que la capacitación en espermatozoides no tratados se incrementó con respecto al tiempo de exposición en el medio TALP-HEPES, este incremento mostró diferencia significativa a los 60 y a los 240 min ($P < 0.05$) con respecto a 0 min (Figura 2 y Cuadro 2).

Se corroboró que la viabilidad tiene una tendencia a mantenerse con respecto al tiempo de exposición al medio capacitante, esta diferencia fue significativa a los 240 min (Figura 2 y Cuadro 2) como en la estandarización.

	% de Viabilidad con IP			% de Capacitación con M540.		
Tiempo en minutos.	0	60	240	0	60	240
Valores Extremos.	91-90	89-73	84-60	22-13	44-25	52-23
Medianas	88	82	82	18	38	51

Cuadro 2.- Mediana y valores extremos de los porcentajes de capacitación de espermatozoides no tratados obtenidos durante la estandarización de la técnica citométrica con M540. El porcentaje de capacitación se incrementa con respecto al tiempo de exposición al medio capacitante, mientras que la viabilidad, que se cuantificó como referencia, decrece siendo significativa hasta los 240 min. n=3.

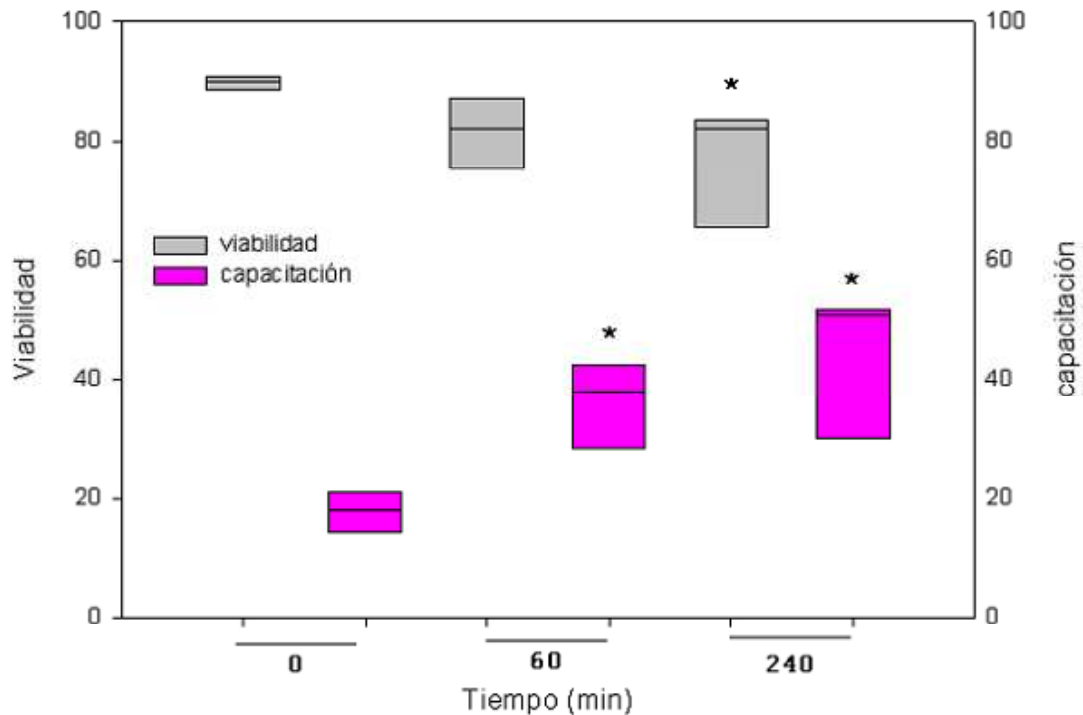


Figura 2. Se muestra la gráfica de los porcentajes de capacitación de espermatozoides conservados y no tratados. Se observa que la capacitación se incrementó con respecto al tiempo de exposición al medio capacitante, la cual mostró diferencia significativa a los 60 y 240 min ($p < 0.05$) con respecto a 0 min, mientras que la viabilidad es significativa a los 240 min con respecto a 0 min ($*P < 0.05$). También se muestran los porcentajes de viabilidad que se usaron como referencia del estado funcional de los espermatozoides.

8.3 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A ETANOL AL 5% EN MEDIO TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR POR UNA HORA SOBRE LA VIABILIDAD.

Ya establecidas las condiciones de viabilidad y capacitación en espermatozoides no tratados, se procedió a evaluar el efecto del etanol en su concentración máxima sobre la viabilidad, reportada previamente por Betancourt y colaboradores (2006).

Para este experimento, a los espermatozoides conservados por 24 h en diluyente comercial se les evaluó la normoespermia y se lavaron. Luego se mantuvieron en presencia de 0 (control) ó 5% de etanol disuelto en medio TALP-HEPES no suplementado (espermatozoides tratados), durante 60 min. Posteriormente se incubaron en medio TALP-HEPES suplementado con albúmina sérica bovina y piruvato de sodio durante tres horas. Se tomaron alícuotas a las 0, 1 y 3 horas posteriores al tratamiento (hpt). En el Cuadro 3 se muestra la mediana y los datos extremos.

El tratamiento con etanol al 5% afectó significativamente la viabilidad de los espermatozoides con respecto al control, tanto a 1 como a 3 hpt ($p < 0.05$) (Cuadro 3). Como en los ensayos previos, los valores de viabilidad tratados con 0% de etanol mostraron una tendencia a decrecer con respecto al tiempo, independientemente del tratamiento.

	Etanol 0%			Etanol 5%		
Horas postratamiento.	0	1	3	0	1	3
Valores Extremos	100-75	79-60	69-52	86-74	67-60	61-40
Mediana	89	73	63	81	60	45

Cuadro 3.- Se muestran las medianas y valores extremos de los porcentajes de viabilidad de espermatozoides de 3 experimentos independientes para evaluar el efecto del tratamiento con etanol durante una hora. Se cuantificó la viabilidad a 0, 1 y 3 hpt sin la adición y con el 5% de etanol por CF con IP.

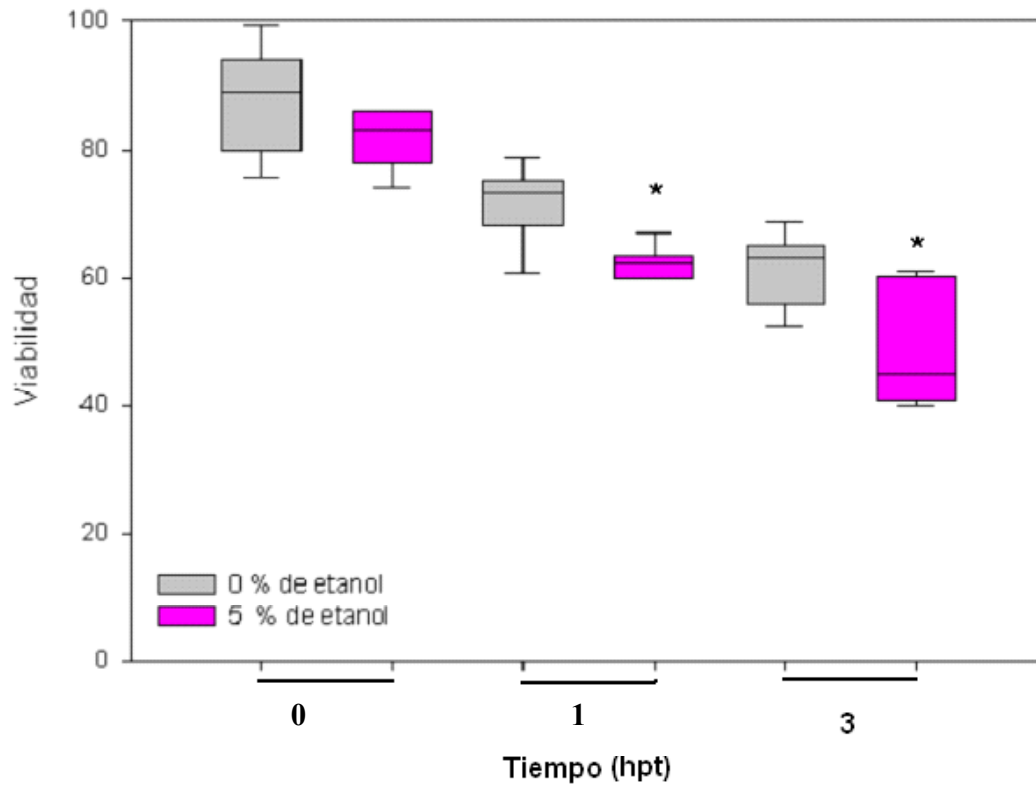


Figura 3. Se muestran las medianas y valores extremos de los porcentajes de viabilidad de espermatozoides, para evaluar el efecto del tratamiento con etanol durante una hora. Se cuantificó la viabilidad a 0, 1 y 3 hpt sin la adición y con el 5% de etanol por CF con IP. El etanol al 5% afectó significativamente la viabilidad con respecto al control a 1hpt y 3hpt. Como en los ensayos previos, la viabilidad se vio afectada con respecto al tiempo, independientemente del tratamiento. Se realizaron 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$

8.4 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A ETANOL EN CONCENTRACIONES INFERIORES AL 5% POR UNA HORA EN MEDIO TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR, SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES.

Dado que el etanol al 5% mostró un efecto negativo y significativo sobre la viabilidad, esta concentración se descartó y se realizó una evaluación del efecto de concentraciones inferiores de etanol sobre la viabilidad de los espermatozoides durante 1 hora y posteriormente incubados en medio capacitante. Se tomaron alícuotas a las 0, 1 y 3 hpt para evaluar la viabilidad, n=5; para los ensayos con el 2% de etanol, n=4.

Las concentraciones de etanol que se probaron fueron 0.5, 1, 2 y 3% en medio TALP-HEPES sin suplementar. Para evaluar el efecto del tratamiento con etanol se utilizó como control espermatozoides incubados por 1h en medio TALP-HEPES sin la adición de etanol. Al comparar con el control de cada tiempo, ninguna concentración mostró diferencia significativa, a excepción de 0.5%, 3 hpt que mostró un ligero incremento, que por ser un dato aislado se consideró como debido al azar.

	0%			0.5%			1%			2%			3%		
Horas postratamiento	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3
Valores Extremos	90-74	86-51	78-56	92-71	88-66	82-52	91-72	88-60	78-62	87-58	80-53	79-60	89-65	83-51	84-43
Medianas	83	71	68	86	78	77	88	76	70	85	73	66	81	70	62

Cuadro 4.- Se muestran las medianas y valores extremos de los porcentajes de viabilidad de los espermatozoides tratados por 1h con 0.5, 1, 2 y 3% de etanol. Los resultados se obtuvieron por CF con la adición de IP. Para evaluar el efecto del tratamiento con etanol se utilizó como control de tratamiento a espermatozoides incubados por 1h en medio TALP-HEPES sin la adición de etanol. Se cuantificó la viabilidad a 0, 1 y 3 hpt. n=5 y n=4 solo en 2%. P> 0.05.

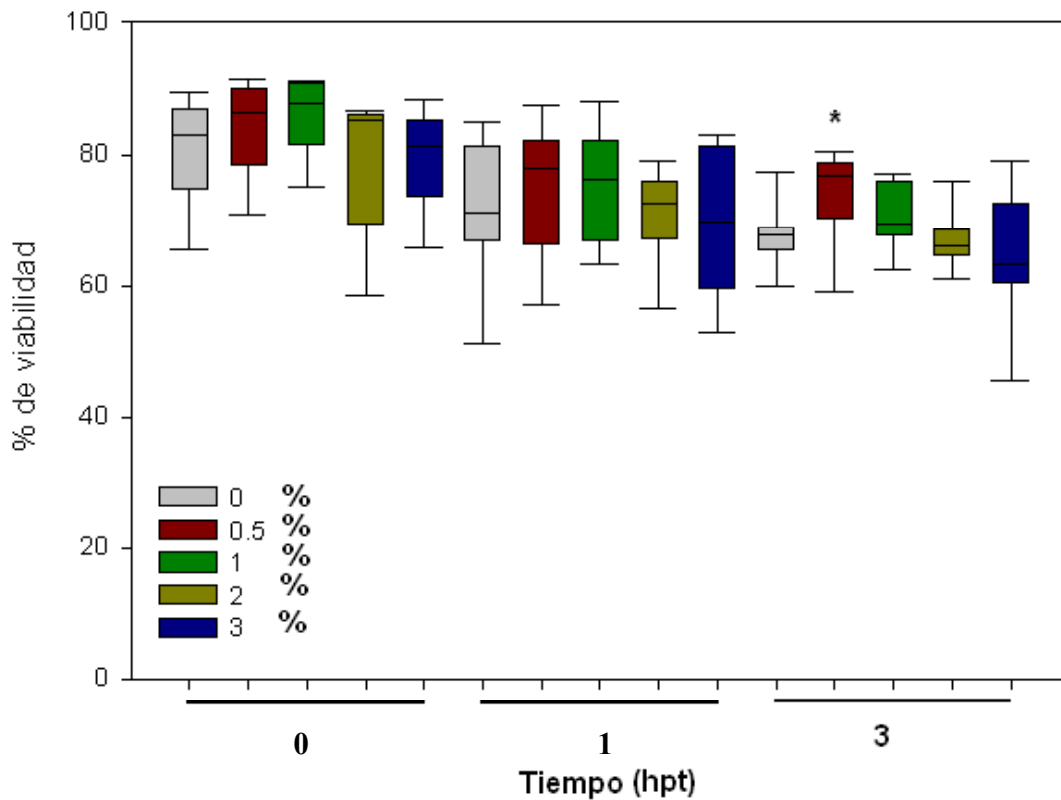


Figura 4. Se grafican los porcentajes de viabilidad de espermatozoides expuestos a 0.5, 1, 2, y 3% de etanol. Al comparar el efecto de las diferentes concentraciones con el control de cada tiempo, ninguna mostró diferencia significativa a excepción de 0.5% que mostró un incremento durante 3 hpt, por ser un dato aislado se consideró como debido al azar. n=5 y n=4 solo en 2%. * p<0.05.

8.5 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS A 0.5, 1, 2 Y 3% DE ETANOL POR UNA HORA EN TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR SOBRE LA CAPACITACIÓN.

Otra serie de ensayos consistió en determinar si el etanol presentaba un efecto sobre la capacitación espermática. Con este fin, una vez que se determinó que el etanol no tuvo efecto sobre la viabilidad se probaron las mismas concentraciones, exponiendo por 1h a los espermatozoides como en la sección 8.4. Se lavaron y se les indujo la capacitación incubándolos en medio TALP-HEPES suplementado con albúmina sérica bovina y piruvato de sodio. Se realizaron cinco ensayos independientes.

Ninguno de las concentraciones mostró diferencia significativa con respecto al control a las 0, 1 y 3 hpt (Figura 5). Tampoco se observó la tendencia a incrementar el porcentaje de capacitación en los controles, observado en los espermatozoides no tratados. Por lo cual, se consideró que este fenómeno es atribuible a la hora de exposición de los espermatozoides al TALP-HEPES sin suplementar.

Con este experimento se estableció que el comportamiento de la capacitación de los espermatozoides incubados en TALP-HEPES sin etanol ni FE no muestra un incremento con respecto al tiempo de exposición al medio capacitante (Figura 5), como se esperaría en espermatozoides no tratados (Figura 2).

Después de haber demostrado que las concentraciones de 0.5 a 3% de etanol no afectaron la viabilidad ni la capacitación, se procedió a realizar los experimentos con el FE.

	0%			0.5%			1%			2%			3%		
Horas postratamiento	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3
Valores Extremos	48-13	42-8	38-6	46-13	44-14	35-10	48-14	45-12	43-11	63-20	50-14	42-9	51-17	53-12	50-7
Mediana	31	22	22	27	26	15	27	25	21	31	30	19	29	26	15

Cuadro 5.- Mediana y valores extremos de la capacitación del experimento para evaluar el efecto del tratamiento con etanol por una hora de espermatozoides conservados. Se cuantificó la capacitación a 0, 1 y 3 h posteriores al tratamiento (hpt) sin la adición y con el 0.5, 1, 2 y 3% de etanol por CF y M540, n=5 excepto 2%. n=4.

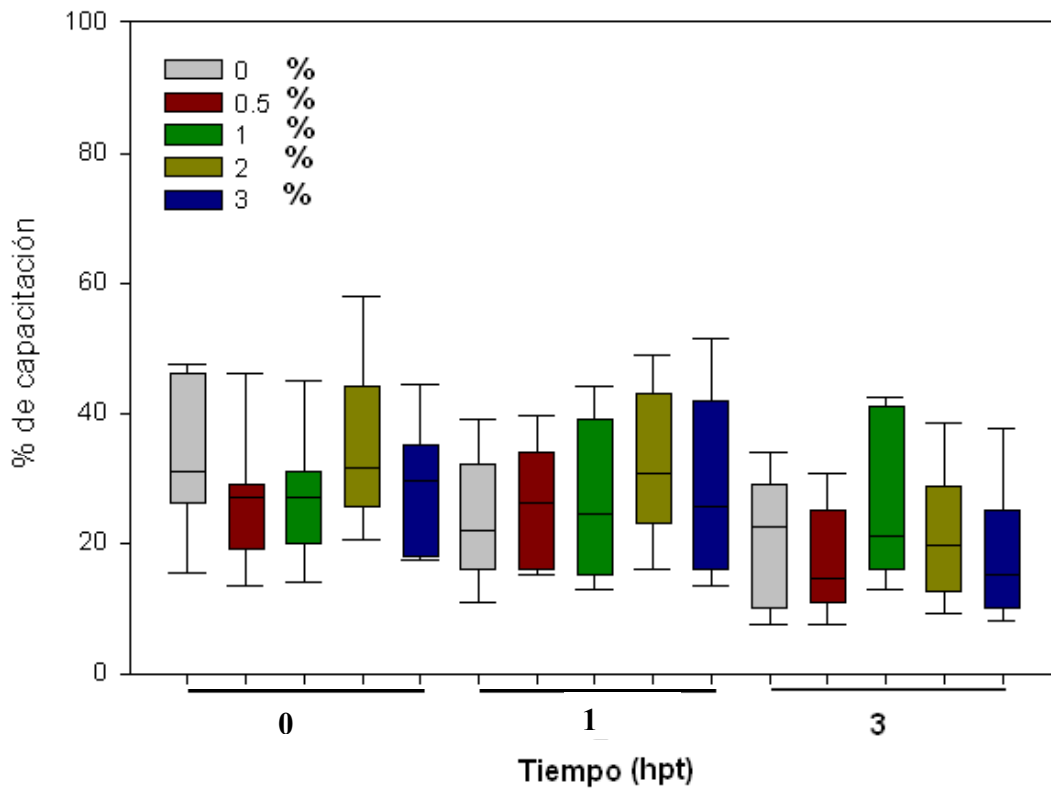


Figura 5. Se grafican los porcentajes de capacitación de espermatozoides tratados con etanol. El control consistió en la incubación por 1h sin etanol y sirvió para caracterizar el comportamiento de la muestra posterior al tratamiento. No se observó un incremento de la capacitación, con respecto al tiempo de exposición a TALP-HEPES. De las concentraciones de etanol analizadas con respecto al control, en cada uno de los tiempos ninguna mostró diferencia significativa con respecto al control de cada tiempo ($p>0.05$).

8.6 EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD POR EXPOSICIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A 50, 100, 200 Y 300 μM DE FE EN TALP-HEPES SIN SUPLEMENTAR.

Habiendo establecido las condiciones experimentales, el siguiente objetivo fue determinar el efecto del FE sobre la viabilidad de los espermatozoides a 50, 100, 200 y 300 μM durante 1h en medio TALP-HEPES sin suplementar, posteriormente lavados e incubados ahora en medio TALP-HEPES suplementado (condiciones capacitantes) del cual se tomaron alícuotas para su análisis a las 0, 1 y 3 hpt (Cuadro 6).

Al analizar los resultados, se observa que en cada serie de valores correspondientes a 0, 1 y 3 hpt, la viabilidad decrece con respecto al control. A 0 hpt solo en las concentraciones de 200 y 300 μM , la viabilidad disminuyó significativamente. A 1 hpt afectó en todas las concentraciones. Mientras que a 3 hpt, dado que en el control disminuye la viabilidad, los valores a las concentraciones 50, 100 y 200 μM dejan de ser diferentes a excepción de 300 μM , (Figura 6 y Cuadro 6).

Al observar los valores de viabilidad del control a lo largo de las tres horas de capacitación se observa una tendencia a disminuir. Al comparar los valores de viabilidad para cada concentración con el control, el FE acelera el decremento de este parámetro. Sin embargo, a las tres horas las concentraciones de 50 100 y 200 μM no presentan diferencia con respecto al control, por disminución de la viabilidad en éste. En la concentración de 300 μM este decremento persiste.

	0 μ M			50 μ M			100 μ M			200 μ M			300 μ M		
Horas postratamiento	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3
Valores Extremos	89-58	91-70	78-64	88-65	83-57	79-52	89-72	82-60	80-61	81-51	78-53	74-60	77-44	77-47	68-32
Medianas	81	81	70	78	76	74	82	78	74	69	71	70	62	60	58

Cuadro 6.- Mediana y valores extremos de la viabilidad de espermatozoides, obtenidos después del tratamiento por una hora con 0, 50, 100, 200 y 300 μ M de FE en medio TALP-HEPES. Se cuantificó la viabilidad por CF y la adición de IP. n=5. El FE provoca disminución de la viabilidad a 0 hpt, en las concentraciones de 200 y 300 μ M, a 1hpt la disminuye en todas las concentraciones, y a las 3hpt los valores se igualan con el control con excepción de la concentración de 300 μ M, la cual continúa siendo menor al control.

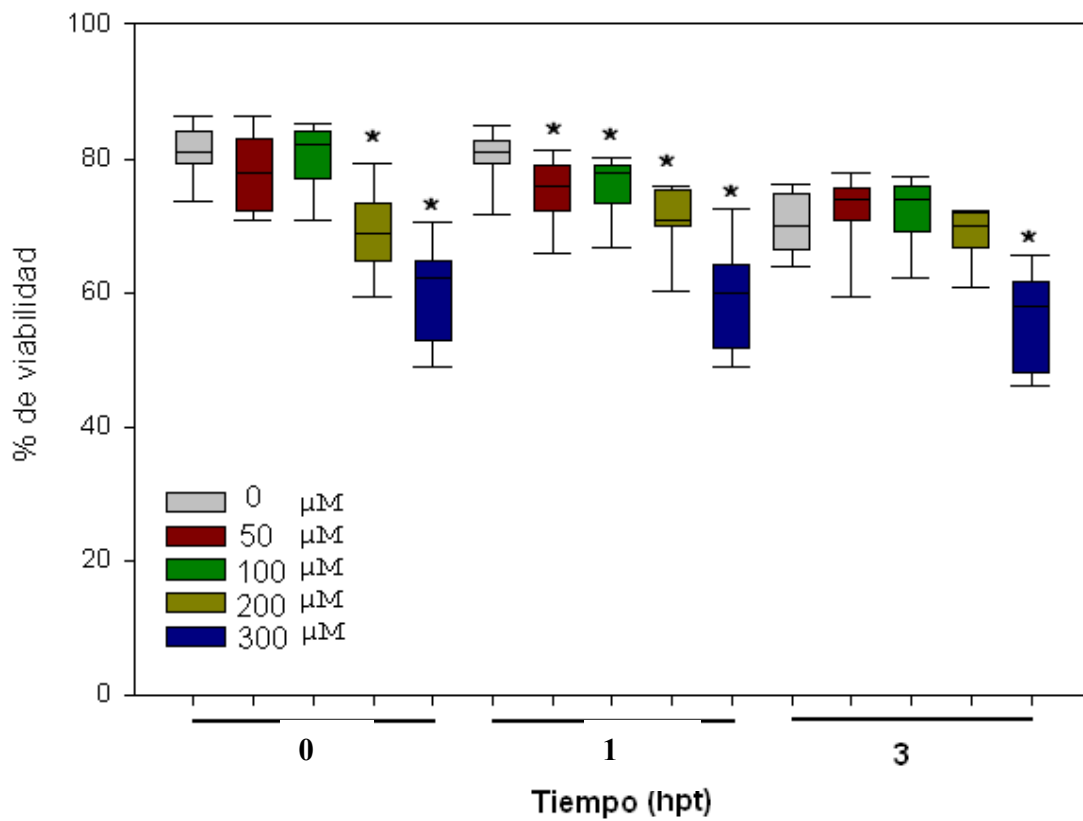


Figura 6. Los resultados mostraron que el FE afecta la viabilidad de forma significativa desde la 0 hpt, en las concentraciones de 200 y 300 μM, a 1hpt afecta de forma significativa en todas las concentraciones y 3hpt los valores se igualan con el control con excepción de la concentración de 300 μM la cual continúa siendo significativamente inferior al control. *p<0.05.

8.7 EFECTO SOBRE LA CAPACITACIÓN POR EXPOSICIÓN DE ESPERMATOZOIDES POR UNA HORA A 50, 100, 200 Y 300 μM DE FE TALP- HEPES SIN SUPLEMENTAR.

El siguiente objetivo fue determinar si el FE mostraba efecto sobre la capacitación espermática, analizada con M540, posterior a la exposición de los espermatozoides a 50, 100, 200, y 300 μM del herbicida durante 1h, y posteriormente lavados e incubados en medio capacitante durante tres horas, se tomaron alícuotas a las 0, 1 y 3 hpt.

Al analizar por separado los valores de capacitación en cada una de las horas, los resultados muestran que la exposición a FE a las 0 y 1 hpt incrementa significativamente el intercalamiento de la M540 en todas las concentraciones probadas con respecto al control, mientras que a 3 hpt solo lo hace en la concentración de 300 μM (Cuadro 7 y Figura 7).

De la misma manera que la viabilidad, al analizar los datos de cada una de las concentraciones con respecto al tiempo, se encuentra que existe una disminución gradual en los valores de capacitación del control, de forma diferente a lo ocurrido en la estandarización. Este fenómeno también ocurre en los espermatozoides tratados con las diferentes concentraciones. Sin embargo, se considera propio del sistema debido a que también ocurre en el control.

	0 μ M			50 μ M			100 μ M			200 μ M			300 μ M		
Horas postratamiento	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3
Valores Extremos	36-20	47-11	30-17	45-24	44-22	28-8	54-16	49-27	41-6	75-36	63-19	40-11	81-46	81-16	55-11
Mediana	29	26	19	39	33	22	41	36	27	66	58	31	67	57	26

Cuadro 7.-Se muestran las medianas y valores extremos de los porcentajes de capacitación de los espermatozoides tratados por 1h con 0, 50, 100, 200 y 300 μ M de FE. Los resultados se obtuvieron por CF con la adición de M540 Para evaluar el efecto del tratamiento con FE se utilizó como control a espermatozoides incubados por 1h en medio TALP-HEPES sin la adición del herbicida. Se cuantificó la capacitación a 0, 1 y 3 hpt. n=5.

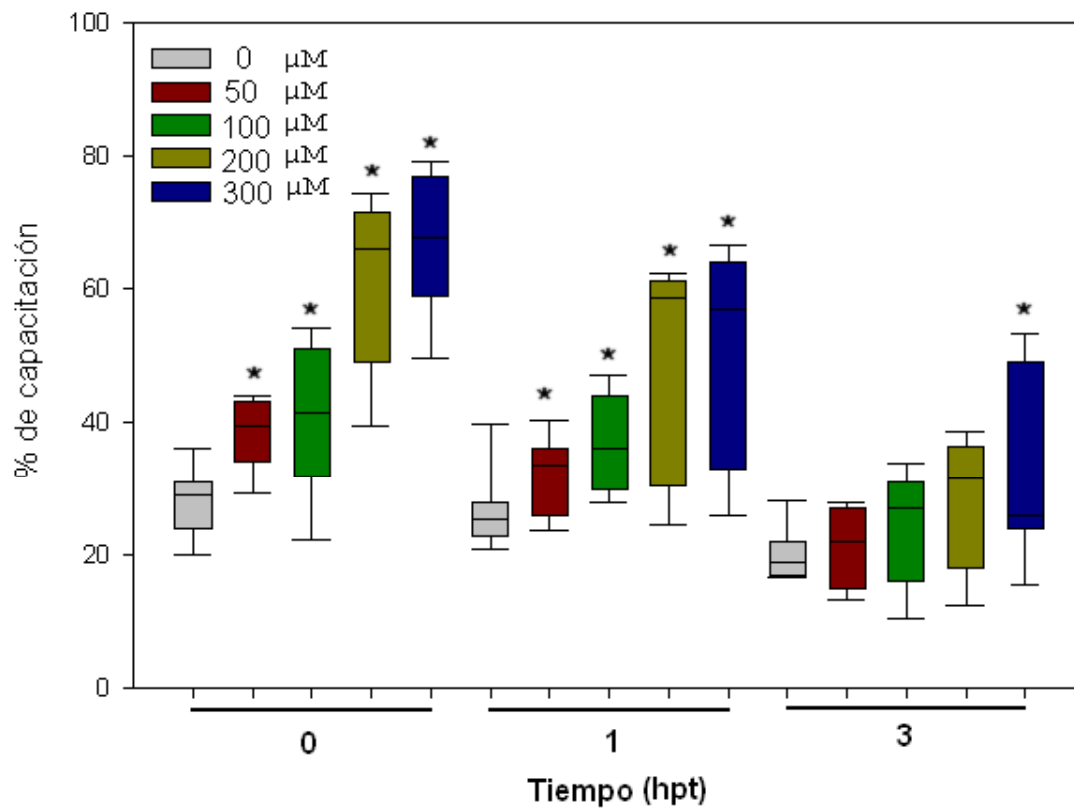


Figura 7. Los resultados de capacitación de espermatozoides tras la exposición a FE muestran que incrementa significativamente el intercalamiento del colorante en todas las concentraciones probadas con respecto al control a la 0 hpt y a la 1 hpt, mientras que a las 3 hpt sólo lo hace en 300 μM. * p<0.05.

9 DISCUSIÓN.

Aunque el proceso de capacitación espermática fue descubierto desde los años 50's, a la fecha no se conocen completamente los mecanismos moleculares que lo desencadenan (Brewis y cols., 2005a). Sin embargo, se considera que la capacitación le proporciona al espermatozoide el movimiento y la direccionalidad que le permitirán alcanzar al ovocito, interaccionar con su zona pelúcida, con su membrana y fertilizarlo (Burkin y Miller, 2000).

Para poder llevar a cabo estos procesos, el espermatozoide tiene que revertir los cambios ocurridos en su tránsito por el epidídimo y que le impiden adquirir su capacidad fertilizante inmediatamente después de ser eyaculado. Algunos procesos observados son: i) remoción de moléculas incorporadas a la membrana plasmática durante su paso por el epidídimo (Voglmayr y Sawyer, 1986) ii) remoción de residuos de ácido siálico (Langlais y Roberts, 1985), iii) incremento del consumo de oxígeno para la producción de energía (Garrido y cols., 2004) iv) flujo de colesterol (Davis, 1982; Ravnik y cols., 1993), v) cambios en la distribución de zonas afines a lectinas en la membrana vi) cambios en el ingreso, distribución y acumulación de Ca^{++} , así como vii) desempaquetamiento de los fosfolípidos debido a un desorden en la membrana, provocado por una tranlocasa de fosfolípidos que al parecer es inducida por bicarbonato y por una redistribución del colesterol (Brewis y cols., 2005b; Flesch y cols., 2001; Nagy y cols., 2003; Hernández y cols., 2005). Adicionalmente algunos de estos procesos han sido utilizados como marcadores del proceso de capacitación por diferentes autores.

En el caso específico del aumento de la fluidez en la membrana como consecuencia del desorden fosfolipídico, algunos autores han establecido que no ocurre en todas las especies por lo que este fenómeno no sería el más adecuado como marcador para verificar la capacitación (Muratori y cols., 2004). Sin embargo, se ha reportado que este desorden de los fosfolípidos sí ocurre en cerdos (Flesch y cols., 2001; Hernández y cols., 2005) y en este trabajo se encontró por CF y M540, que también ocurre en espermatozoides conservados

por 24h en diluyente comercial y sin tratamiento (Figura 2 y Cuadro 2). Por lo que se considera que esta metodología aunada a la de evaluación de la viabilidad con IP se puede utilizar para monitorear ambos fenómenos simultáneamente durante los tratamientos.

En los tratamientos experimentales debido a las propiedades de solubilidad del FE, se tuvo que diluir en etanol para preparar la solución de trabajo, de la cual se tomaba la cantidad necesaria de mezcla etanol-FE para alcanzar la concentración deseada del herbicida en el medio de cultivo. Debido a esto, primero se descartó el efecto del solvente sobre la viabilidad. Betancourt y colaboradores (2006) previamente reportaron que la incubación de espermatozoides con etanol al 5% no afectó su movilidad ni su viabilidad por lo que inicialmente se probó esta concentración, sin embargo en los experimentos realizados, esta concentración afectó la viabilidad a partir de 1hpt.

A este respecto, cabe destacar que los autores utilizaron espermatozoides recién eyaculados, a los que expusieron a etanol por una hora e inmediatamente se lavaron y analizaron. En el presente trabajo, las células contaban con al menos 24h de conservación en un diluyente comercial, antes del tratamiento con etanol por una hora, y su capacitación en medio TALP-HEPES. Lo anterior, puede estar sensibilizando a los espermatozoides a los tratamientos, debido a que los diferentes componentes de los diluyentes pueden afectar la fisiología de los espermatozoides (Guthrie y cols., 2005). Fenómeno al que se puede estar sumando el efecto del etanol.

El efecto adverso del 5% de etanol sobre la viabilidad de espermatozoides conservados motivó que se evaluara este parámetro con tratamientos de 0, 0.5, 1, 2 y 3% de etanol sobre la viabilidad de los mismos. Los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos salvo con el 0.5% en el que la diferencia fue por incremento y atribuible al azar.

El modelo experimental *in vitro* con los tratamientos requería una curva de concentración-respuesta para determinar la CL50 para los espermatozoides

tratados. Esta no se pudo determinar con los experimentos realizados, porque para aumentar la concentración de FE en el medio, también se tiene que incrementar la concentración de etanol, y su concentración máxima que no afecta a la viabilidad en este modelo es el 3%, por lo que con este solvente la concentración máxima fue de 300 μ M del herbicida.

Con las mismas muestras en las que se evaluó la viabilidad también se evaluó la capacitación, y se observó un comportamiento diferente de los espermatozoides conservados-tratados, con respecto a los espermatozoides conservados-no tratados. Este comportamiento consistió en un decremento en el porcentaje de capacitación a lo largo de la cinética, en lugar del aumento esperado con respecto al tiempo de exposición al medio capacitante, que se registró durante los experimentos para estandarizar la técnica de capacitación. Cabe destacar que este decremento se presentó en todas las concentraciones de etanol, aún en el control (etanol 0%) y no mostró ninguna tendencia dependiente de la concentración de etanol (Figura 4). Además, las medianas del porcentaje de viabilidad de los diferentes tratamientos son muy similares, lo que indica que éste es el comportamiento de los espermatozoides conservados-tratados en las condiciones de este estudio.

El comportamiento de la muestra descrito anteriormente puede deberse a la influencia del tiempo de conservación de los espermatozoides en el diluyente, desde que se obtuvo la muestra hasta el momento del tratamiento, lo que da como resultado un aumento en la capacitación espermática; esto se puede observar en los valores de capacitación de espermatozoides intactos los cuales son altos, fenómeno observado por Conejo-Nava (2003) en muestras frescas conservadas en un diluyente de larga duración, aunque él lo observó hasta el cuarto día de almacenamiento.

Este mismo efecto del medio diluyente sobre la muestra, se ha reportado en otros trabajos en donde se ha observado un incremento de hasta del 18.9% en los espermatozoides positivos a la tinción con anexina V (considerados capacitados) a las 24 horas de conservación (Guthrie y cols., 2005), tal como se encontró en el

presente trabajo, aunque en este caso, este fenómeno puede estarse sumando a las condiciones de tratamiento (los lavados y el tiempo adicional en el medio TALP-HEPES sin suplementar). Sin embargo, todas estas observaciones se consideraron como inherentes al modelo de trabajo y se cuantificaron los cambios tomando como referencia los valores obtenidos en los controles negativos.

Una vez que se descartó el posible efecto del etanol sobre la viabilidad y la capacitación hasta la concentración de 3% que fue la más alta utilizada, se analizó el efecto a 0, 50, 100, 200, y 300 μM de FE, disueltos en etanol sobre la viabilidad. Se encontró, que el herbicida disminuye significativamente la viabilidad en las concentraciones de 200 y 300 μM , desde 0 hpt con respecto al control. Las condiciones para viabilidad de este experimento son comparables con las de Betancourt y colaboradores (2006), pero ellos a este tiempo de tratamiento obtienen diferencia significativa desde 50 μM . Aunque nuestros resultados a 1 hpt mostraron efecto significativo sobre la viabilidad de los espermatozoides expuestos a FE desde 50 μM . Al final de la cinética ó 3 hpt todos los valores de viabilidad se uniforman con los valores del control negativo y sólo 300 μM sigue mostrando diferencias significativa con el control.

En conjunto, los resultados de viabilidad mostraron un comportamiento que sugiere que las dosis 50, 100 y 200 μM de FE sólo aceleran la mortandad de los espermatozoides más susceptibles de forma dependiente de la concentración y este fenómeno se revierte a las 3 hpt, tiempo en el que los valores de viabilidad del control alcanzan los valores de viabilidad de casi todas las concentraciones, a excepción de 300 μM lo que se puede deber a que la disminución de la viabilidad es un fenómeno intrínseco del proceso de capacitación. Sin embargo, la dosis de 300 μM afecta la viabilidad de los espermatozoides de manera más drástica y su efecto es más deletéreo incluso en 3 hpt.

Aunque no se pudo calcular la CL_{50} para espermatozoides conservados por 24 horas en diluyente comercial y tratados por una hora con FE, debido a las razones técnicas ya explicadas, en ninguna de las concentraciones las medianas de los

resultados de viabilidad obtenidos en los diferentes tiempos de exposición al herbicida son menores al 50% por lo que se puede considerar que el efecto observado por los tratamientos fue en concentraciones subletales.

El descenso de la viabilidad en los espermatozoides, causado por la exposición a FE desde 200 μM es similar a los datos de viabilidad reportados por Betancourt y colaboradores (2006) donde se encontró un efecto desde 50 μM ; éstos datos se encuentran en concordancia con el efecto sobre la viabilidad de otras células germinales como los ovocitos reportado por Casas y colaboradores (2007) donde se encontró que el FE afecta de manera significativa desde 100 μM .

En el mismo trabajo Betancourt y cols. (2006), estudiaron la movilidad espermática con análisis de imágenes computarizada (CASA) tras el tratamiento con FE y determinaron que inhibía algunos los parámetros de la movilidad espermática, lo que sugirió la posibilidad de que tras la exposición de los espermatozoides al herbicida el proceso de capacitación se encontrara afectado.

Con el objeto de hacer un seguimiento de la capacitación en los espermatozoides tratados con FE se usó la M540 que se intercala en la membrana de los espermatozoides con un alto desorden fosfolipídico, fenómeno que se considera directamente relacionado con la capacitación espermática. Los resultados del presente estudio mostraron que la exposición de los espermatozoides a FE favoreció el intercalamiento del fluorocromo de manera dependiente de la concentración con respecto del control, efecto que es más evidente en los espermatozoides analizados inmediatamente después del tratamiento (0 hpt) y va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de exposición al medio capacitante (1 y 3 hpt), sin embargo este fenómeno no necesariamente puede ser considerado como capacitación, debido a que la movilidad también se ve afectada por la exposición a este herbicida (Betancourt y col., 2006) e históricamente se considera a la movilidad como un componente muy importante del proceso de capacitación (Yanagimachi, 1994).

Se sabe desde hace algún tiempo que la flexión del flagelo que produce el movimiento del espermatozoide es debida a la flexión de los componentes del axonema y que este proceso es dependiente de ATP por la actividad ATPasa de la dineína. Sin embargo, no se ha determinado cuáles son los mecanismos que disparan la disponibilidad de ATP, ni como se coordina con el resto de los eventos de la capacitación. Se ha propuesto que los cambios en la simetría y disposición de los diferentes componentes de la membrana como los fosfolípidos y glicoproteínas están involucrados en este proceso (Myles y Primacoff, 1985; White y cols., 2000; Domino y cols., 2001; Brewis y cols., 2005) lo que propicia distintos requerimientos iónicos, y de actividad celular (Mortimer, 1997; Brewis y cols., 2005).

El FE puede estar modificando las condiciones fisicoquímicas del medio de capacitación, favoreciendo la salida del colesterol de las membranas fosfolípicas a todo lo largo del espermatozoide de una forma descontrolada. Además puede estar lipoperoxidando a la membrana espermática tal y como se ha demostrado en plantas (Luo y cols., 2004). Lo anterior explicaría el aumento en la fluidez de las mismas, favoreciendo el intercalamiento de la M540 y el consecuente incremento en la fluorescencia de los espermatozoides tratados con el herbicida, inclusive en regiones donde aparentemente no se requiere como la cola. De esta manera se estaría impidiendo la adecuada activación de canales de calcio inhibiendo la movilidad (Betancourt y cols., 2006). Tampoco se descarta que el FE interrumpa una vía de señalización y le impida al espermatozoide llevar la secuencia normal de los eventos relacionados con la capacitación.

In vivo, la capacitación de espermatozoides de pacientes normoespérmicos, muestra un flujo del colesterol y el consecuente aumento en la fluidez de la membrana, favorece el incremento de AMPc como respuesta al estímulo del bicarbonato a una adenilato ciclasa soluble, y un subsecuente aumento en la fosforilación de proteínas. Mientras que en espermatozoides de pacientes con astenozoospermia, (espermatozoides inmóviles) se ha encontrado que la fluidez de la membrana se encuentra modificada, por lo que existe un déficit en los

patrones de fosforilación de tirosinas de proteínas, asociadas con la capacitación y localizadas en la cola del espermatozoide por lo que los pacientes muestran movilidad espermática e hiperactivación reducida (Yunes y cols., 2003).

Las empresas proveedoras de los productos de uso agrícola como los herbicidas insisten en que sus productos tienen una inocuidad probada y que su desuso induciría graves daños económicos. Sin embargo, se ha demostrado que los herbicidas pueden provocar graves daños a la salud en general, ya que estas sustancias persisten y se acumulan en algunos ambientes, como es el caso del Diclofop que es un integrante de la misma familia de herbicidas que el FE (Waite y cols., 2004).

Se ha probado que la calidad del semen ha disminuido aumentando el riesgo de infertilidad masculina. Este decremento en los parámetros de normoespermia se ha atribuido a las actuales condiciones de tratamiento de los alimentos, y en este tenor se ha determinado que los pesticidas inducen reprotoxicidad, ya sea interrumpiendo la función endocrina de las hormonas o alterando la función de las células de Leydig y de Sertoli o dañando directamente al espermatozoide (Klaassen, 2001; Bretveld y cols., 2006; Bretveld y cols., 2007 Vargas y cols., 2005; Skakkebaek y cols., 2006).

En otro estudio se encontró que existe una relación entre la calidad de semen con la zona geográfica que se habita y la exposición a plaguicidas (Swan, 2006); además algunos plaguicidas organoclorados se han encontrado en el semen de humanos (Magnusdottir y cols., 2005).

Todo lo anterior hace suponer que los plaguicidas se encuentren relacionados con algunos padecimientos reproductivos. En particular el FE puede estar involucrado con daño a la membrana del espermatozoide, en particular con la astenozoospermia, debido a que además induce inmovilidad de los espermatozoides.

10 CONCLUSIONES.

Las metodologías utilizadas en este trabajo permitieron evaluar la capacitación y la viabilidad por CF durante los tratamientos con las diferentes sustancias.

El tratamiento por una hora con etanol en concentraciones inferiores al 3% no afectó la viabilidad ni la capacitación de los espermatozoides.

El tratamiento por una hora con FE afectó la viabilidad de los espermatozoides, incrementando la mortalidad en un máximo de 50%. Por lo que se puede considerar que el efecto observado sobre la capacitación fue en concentraciones subletales.

El tratamiento por una hora con FE, incrementó el número de espermatozoides positivos a la tinción con M540 con respecto al control. Esto puede deberse a que el FE esté promoviendo la salida del colesterol de las membranas de una forma descontrolada y/o puede estar lipoperoxidando a los fosfolípidos tal y como se ha demostrado en plantas.

11 APENDICE 1.

11.1 Medios y Soluciones.

11.1.1 PBS

	g/L
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.2
KH ₂ PO ₄	0.163
pH 7.2-7.3	

11.1.2 TALP-HEPES.

	g/L
NaCl	5.84
Lactato de sodio	3.08
carbonato de calcio	2.1
HEPES	2.38
KCl	0.23
CaCl ₂	0.31
NaH ₂ PO ₄	0.04
MgCl ₂	0.3
PH 7.2-7.3	

11.1.3 TALP-HEPES suplementado.

Piruvato de sodio 0.011g/L de Medio TALP-HEPES.

Albúmina sérica bovina 0.3g/L de Medio TALP-HEPES base.

PH 7.2-7.3, CO₂ 5% y 39°C

11.1.4 TINCIÓN CON EOSINA-NIGROSINA.

Eosina (Sigma®) 1 g

Nigrosina (Sigma®) 5 g

en 100mL

Se disuelve en agua bi-distilada y se esteriliza por filtración.

11.1.5 TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO.

Se agregó IP para alcanzar una concentración final de 483 µg/mL y se midió con el citómetro de flujo, no más de 5 minutos después de agregado.

11.1.6 TINCIÓN CON MEROCIANINA 540.

A 400 µL de la suspensión de espermatozoides se le adicionaron 0.5 mg/mL de Polivinil alcohol, 0.5mg/mL Polivinil pirilidona y el fluorógeno M540 (Molecular Probes) para alcanzar una concentración final de 2.7 µM (Rathi y cols., 2001) 10 minutos antes del ensayo.

12 REFERENCIAS.

Bavister, B. 1989. Aconsistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. Gam Res 23: 139-158.

Bayer. 2006. Ficha técnica. <http://www.bayer.com>

Belsey, M. 1980. Laboratory manual for the examining of the human semen and semen-cervical mucus interaction. Worl Health Organitation. Suiza.

Betancourt, M. Reséndiz, A. Casas, E. Fierro, R. 2006. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) *in vitro*. Reprod Toxicol 22: 508-512.

Bonilla, E. Altamirano, M. Casas, E. Fierro, R. Ducolomb, Y. Betancourt, M. 2001. Identificación de Reprotóxicos en el Laboratorio. En: Biología de la reproducción II. Ed Javier Velásquez Moctezuma. UAM.

Bretveld, R. Thomas C. Scheepers P. Zielhuis G. Roeleveld N. 2006. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? Reprod Biol Endocrinol 4:1-14

Bretveld, R. Brouwers, M. Ebisch, I. Roeleveld, N. 2007. Influence of pesticides on male fertility. Scand J Work Environ Health. 33:13-28.

Brewis, I. Moore, H. Fraser, L. Holt, W. Baldi, E. Luconi, M. Gadella, B. Christopher, W. Ford, L. Harrison R. 2005a. Molecular Mechanisms During Sperm Capacitation. Hum Fert 8: 253 – 261.

Brewis, I. Van Gestel, R. Gadella, B. Jones. Publicover, R. Roldan E. Frayne, J. Barratt, C. 2005b. The spermatozoon at fertilization: Current understanding and future research directions. Hum Fert. 8: 241 – 251.

Burkin, HR. Miller, D. 2000. Zona pellucida protein binding ability of porcine sperm during epididymal maturation and the acrosome reaction. *Dev Biol.* 222:99-109.

Carlsen, E. Giwercman, A. Keiding, N. Skakkebeak, N. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J.* 365: 609-613.

Casas, E. Bonilla, E. Ducolomb, Y. Betancourt, M. 2007. Differential effect of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on the viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*. XXXIII Reunión anual de la academia de la investigación en biología de la reproducción A.C. pp.153-171.

Caseley, J. 1996. Manejo de malezas para países en desarrollo. FAO. Roma Italia.

Conejo-Nava, J. Fierro, R. Gutierrez, C. Betancourt, M. 2003. Membrane status and *in vitro* capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16°C. *Arch Androl.* 49:287-295.

Costa, L. 1986. Toxicology of pesticides, a brief history. En: Costa, L. Galli, C. And Murphy, S. eds. *Toxicology of pesticides: Experimental Clinical and Regulatory perspectives.* NATO. ASI SERIES. Berlín.

Chang, M. 1984. The meaning of sperm capacitation. *J Androl.* 5: 45-50.

Davis, B. 1982. Uterine fluid proteins bind sperm cholesterol during capacitation in the rabbit. *Experientia* 38: 1063–1064.

Díaz, P. Zarate, M. Carballo, E. Barrón, A. Villegas, H. Alvarado, A. 1994. Efecto protector de la albúmina sobre las membranas del espermatozoide humano en la capacitación *in vitro*. *Perinatol Reprod Hum* 8: 77-82.

Domino, S. Zhang, L. Gillespie, P. Saunders, T. Lowe, J. 2001. Deficiency of Reproductive Tract (1,2)Fucosylated Glycans and Normal Fertility in Mice with

Targeted Deletions of the FUT1 or FUT2 α (1,2)Fucosyltransferase Locus. *Mol Cell Biol.* 21: 8336–8345.

Evenson, D. Jost, L. Marshall, D. 1999. Utility of the sperm chromatin assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 14: 1039–1049.

Flesch, F. Brouwers, J. Nievelstein, F. Verkleij, A. Gadella, B. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci.* 114: 3543-3555.

Garrido, N. Meseguer, M. Simon, C. Pellicer, A. Remohi, J. 2004. Prooxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 6: 59-65.

Guillette, L. Gross, T. Masson, G. Matter, J. Percival, H. Woodward A. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect.* 102: 680–688.

Guthrie, H. Welch, G. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 63:396-410.

Hauser, R. Altshul, L. Chen, Z. Ryan, L. Overstreet, J. Schiff, I. 2002. Environmental organochlorines and semen quality: results of a pilot study. *Environ Health Perspect* 110:229–233.

Hayes, T. Collins, A. Lee, M. Mendoza, M. Noriega, N. Stuart, A. Vonk, A. 2002. Hermaphroditic desmaculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *PNAS* 99: 5476-5480.

Hernández, A. Ortiz, R. Cortes, E. Fonseca, T. 2005. X simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.

Holtum, J. Matthews, J. Häusler, R. Lijegren, D. Powles, S. 1991. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). On the mechanism of resistance to dlicofop methyl. Plant Physiol. 97:1026-1034.

Hull, M. Glazener, C. Kelly, N. 1985. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. Br Med J. 292:1693-1697.

Jimenez I, Gonzalez-Marquez H, Ortiz R, Betancourt M, Herrera J, Fierro R. 2002. Expression of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boars by flow cytometry. Arch. Androl. 48:159-66.

Kawakami, E. Hirano, T. Hori, T. Tsutsui, T. 2004. Protease-Induced hyperactivation of canine spermatozoa associated with disappearance of Lectin-Binding glycoprotein on their surface. J Vet Med Sci 66: 1027-1031.

Klaassen, C. 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic science of poisons. 6ta edit. Mc Graw Hill. EUA.

Knobil, E. Neill, J. 1994. The physiology of the reproduction. 2da Ed. Volumen 1. Raven Press Ltd. New York. EUA.

Langlais, J. Roberts, K. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Res. 12: 183–224.

Lerda, D. Rizzi, R. 1991. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Mutat Res 262: 47–50.

Luo, X. Sunohara Y. Matsumoto H. 2004. Fluazifop-butyl causes membrane peroxidation in the herbicide-susceptible broad leaf weed bristly starbur (*Acanthospermum hispidum*). *Pest Biochem and Physiol* 78: 93–102.

Magnusdottir, E. Thorsteinsson, T. Thorsteinsdottir, S. Heimsdottir, M. Olafdottir, K. 2005. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod.* 20: 208-215.

Mantovani, A. and Maranghi, F. 2005. Risk assessment of chemicals potentially affecting male fertility. *Contraception.* 72: 308-13.

Molecular Probes Inc. 1999. www.molecularprobes.com

Morales, P. Overstreet, J. Kats, D. 1988. Changes in the human sperm motion during capacitation *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 83: 119-128.

Mortimer, S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update.* 3: 403–439.

Muratori, M. Porazzi, I. Luconi, M. Marchiani S. Forti, G. Baldi, E. 2004. Annexin V Binding and Merocyanine Staining Fail to Detect Human Sperm Capacitation. *J. Androl.* 25:797-810.

Myles, D. Primacoff, P. 1985. Sperm surface domains. En: Springer DA, *Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine.* New York: Plenum Press. New York. USA.

Nagy, S. Jansen, J. Topper, K. Gadella, B. 2003. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles. *Biol Reprod.* 68: 1828–1835.

Naz, R. Rajesh, P. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod B Endocrinol.* 2: 1-12.

Nelson, C. Bunge, R. 1974. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil Steril.* 25: 503–507.

Noyes, R. 1953. Fertilizing capacity of spermatozoa. *Westem J. Surc. Obstet. Gynecol.* 61: 342-349.

Nunziata, A. 1998. An overview of current *in vitro* test procedures to reproductive toxicology. En: reproductive toxicology, *in vitro* germ cell developmental toxicology, from science social and industrial demand. Del Mazo J. (Ed.) Plenum Press, New York. EUA.

OMS. 1990. Public Health impact of pesticides used in agriculture. Ginebra Suiza.B

Pflieger-Bruss, S. Schuppe, H. Schill, B. 2004. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia* 36: 337-345.

Ramírez, M 1989. Estudio epidemiológico en mil parejas estériles. *Ginecol Obstet Mex.* 57: 67-72.

Rathi, R. Colenbrander, B. Bevers, M. Gadella, B. 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod.* 65: 462–470.

Ravnik, S. Albers, J. Muller, C. 1993 A novel view of albumin-supported sperm capacitation: Role of Lipid Transfer Protein-I. *Fertil. Steril.* 59: 629–638.

Reyes, A. 1994. Bioquímica de la capacitación- reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.

Rowe, P. Comhaire, F. Hargreave, B. Mellows, H. 1993. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. World Health Organization. Italia.

Simic, B. Kniewald, J. Kniewald, Z. 1994. Effects of atrazine on reproductive performance in the rat. *J Appl Toxicol.* 14: 401-404.

Skakkebaek, N. Jørgensen, N. Main, K. Rajpert-De Meyts, E. Leffers, H. Andersson, A. Juul, A. Carlsen, E. Mortensen, E. Jensen, T. Toppari, J. 2006. Is human fecundity declining? *Inter J Androl.* 29: 2-11.

Spano, M. Bonde, J. Hjollund, H. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril.* 73: 43–50.

Swan, S. Elkin, E. Fenster, L. 1997. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect.* 105:1228–1232.

Swan S. Brazil, C. Drobnis, E. Liu, F. Kruse, R. Hatch, M. 2003a. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect.* 111:414–420.

Swan, S. Robin Kruse, L. Liu, F. Barr, D. Drobnis, E. Redmon, B. Wang, C. Brazil, C. Overstreet, J. 2003b. Semen Quality in Relation to Biomarkers of Pesticide Exposure. *Environ Health Perspect.* 12:1478-1484.

Swan, S. 2006. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J androl.* 29 62–68.

Vargas, A. Ortiz, D. Hernández, I. Tovar, J. Ayala, A. 2005. Análisis epidemiológico de la infertilidad en una población mexicana. *Ginecol Obstet Mex.* 73:360-4.

Voglmayr, K. Sawyer, R. 1986. Surface transformation of ram spermatozoa in uterine, oviduct and cauda epididymal fluids *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 78: 315–325.

Ware, G. 2004. Introducción a los Herbicidas. *The pesticide Book* 6a ed. ED. MeisterPro. Ohio. USA.

Waite, D. Cessna, A. Grover R., Kerr, L. Snihura A. 2004. Environmental Concentrations of agricultural herbicides in saskatchewan, Canada: Bromoxynil, Dicamba, Diclofop, MCPA, and Trifluralin. *J. Environ. Qual.* 33: 1616–1628.

White, D. Aitken, J. 1989. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and Intracellular pH and the Capacity of Hamster spermatozoa to express hyperactivated Motility. *Biol Reprod.* 22: 163-177.

White, D. Weerachayanukul, W. Gadella, B. Kamolvarin, N. Attar, M. Tanphaichitr, N. 2000. Role of Sperm Sulfogalactosylglycerolipid in Mouse Sperm-Zona Pellucida Binding. *Biol Reprod.* 63: 147–155.

Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: *Physiology of the Reproduction.* 2nd ed. Knobil, E., Neill J (Eds). Raven Press Ltd. New York USA. Vol. I.

Yunes, R. Doncel, G. Acosta A. 2003. Incidence of sperm-tail tyrosine phosphorylation and hyperactivated motility in normozoospermic and asthenozoospermic human sperm samples. *Biocell.* 27, 29-36

Zayas, H. Casas, E. Bonilla, E. Betancourt, M. 2005. Inhibition of sperm-zona pellucida binding by a 55kDa pig sperm protein *in vitro*. *Arch Androl.* 51: 195-206.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00032

EFFECTO DEL FENOXAPROP-ETIL (FE) SOBRE LA CAPACITACION DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO IN VITRO.

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 16 del mes de noviembre del año 2007 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ
- DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
- DRA. NORMA ANGELICA MORENO MENDOZA
- DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de última, se reunieron a la presentación de la Idónea Comunicación de Resultados cuya denominación aparece para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: ALEJANDRO HERNANDEZ LOPEZ

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 al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ALEJANDRO HERNANDEZ LOPEZ
FIRMA DEL ALUMNO

REVISO

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE OBS

DR. JOSE FRANCISCO FLORES
PEDROCHE

PRESIDENTA

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

VOCAL

DRA. REYNA CARMEN FIERRO
PASTRANA

VOCAL

DRA. NORMA ANGELICA MORENO
MENDOZA

SECRETARIA

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS
VILLASEÑOR



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Fecha : 15/11/2007

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL del alumno ALEJANDRO HERNANDEZ LOPEZ, matrícula 205182728, quien cumplió con los 210 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha dieciséis de noviembre del 2007 presentó la DEFENSA de su IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS cuya denominación es:

EFFECTO DEL FENOXAPROP-ETIL (FE) SOBRE LA CAPACITACION DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO IN VITRO.

Cabe mencionar que la aprobación de la Idónea Comunicación de Resultados tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 250 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

- aprobada -

JURADO

Presidente

Secretario

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

Vocal

Vocal

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

DRA. NORMA ANGELICA MORENO MENDOZA

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

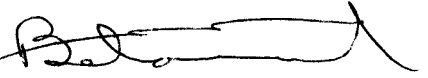
Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina, Del. Iztapalapa CP 09340 México, DF Apodo. Postal 555-320-9000

Tels. 5804-4880 y 4883 Fax 5804-4876

COMITÉ TUTORAL.

Director:

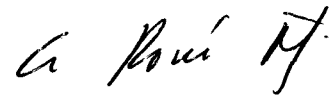
Dr. José Miguel Betancourt Rule.



Profesor Titular "C" T.C. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. bet@xanum.uam.mx

Asesoras:

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz.



Profesora Titular "C" T.C. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. arom@xanum.uam.mx

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

Investigadora. Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
angelica@correo.biomedicas.unam.mx

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor.

Investigadora. Laboratorio de Histomorfología, Instituto Nacional de Pediatría.
marcoviv@servidor.unam.mx