



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

**“Efecto del ácido perfluorooctanoico sobre el flujo del Ca^{2+}
intracelular durante la capacitación in vitro de espermatozoides de
cerdo doméstico”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

P R E S E N T A:

Biol. Exp. Guadalupe Hernández Ojeda

Directora:

Dra. Irma Jiménez Morales

Asesoras:

Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Ciudad de México, Enero 2017

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA:

Dra. Irma Jiménez Morales

Laboratorio de Andrología S-257

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: jimi@xanum.uam.mx

ASESORA:

Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos

Laboratorio de Expresión Génica S-248

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: zayil.salazar@gmail.com

ASESORA:

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo S-255

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: leor@xanum.uam.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

PRESIDENTE

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: leor@xanum.uam.mx

Dra. María Margarita Zayil Salazar

SECRETARIA

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Correo: zayil.salazar@gmail.com

M en C. Ana Lilia Roa Espitia

VOCAL

Departamento de Biología Celular

CINVESTAV-IPN

Correo: aroa670428@hotmail.com

Dr. José Fernando Lazcano Pérez

VOCAL

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: ferlaz@hotmail.com

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I) por permitirme realizar mis estudios de postgrado, a cada uno de los profesores que me regalaron su conocimiento y al personal en general que mantienen las instalaciones en óptimas condiciones para que los alumnos continuemos con nuestros estudios.

Al programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal (MBRA) de la UAM-I, que pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 003797.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo a través de la beca con CVU número 620703.

Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACYT proyecto 105961-M y SEP-CONACYT 180043.

Al laboratorio de Andrología S-257 del Departamento de Ciencias de la Salud, bajo la dirección de la Dra. Irma Jiménez Morales y la asesoría de la Dra. Zayil Salazar Campos y Dra. Leonor Rodríguez Cruz, su apoyo fue indispensable para la realización de este proyecto.

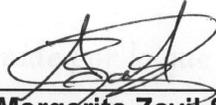
MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Efecto del ácido perfluorooctanoico sobre el flujo del Ca^{2+} intracelular durante la capacitación in vitro de espermatozoides de cerdo doméstico”



Dra. Leonor Rodríguez Cruz
PRESIDENTE

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo: leor@xanum.uam.mx



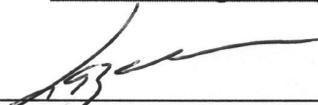
Dra. María Margarita Zayil Salazar
SECRETARIA

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa
Correo: zayil.salazar@gmail.com



M en C. Ana Lilia Roa Espitia
VOCAL

Departamento de Biología Celular
CINVESTAV-IPN
Correo: aroa670428@hotmail.com



Dr. José Fernando Lazcano Pérez
VOCAL

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo: ferlaz@hotmail.com

“...El éxito en la vida no se mide por lo que has logrado, sino por los obstáculos que has tenido que enfrentar en el camino...”

Mahatma Gandhi

DEDICATORIAS

*A mi madre amada Andrea,
El pilar de mi vida, sin ti estaría pérdida*

*A mis bellas hermanas Jesica e Isabel,
Su franqueza me devuelve a la Tierra*

*A Cami y Gabriel,
Son y serán siempre la alegría de mi vida*

*A mi padre Crispín,
Tu ausencia no nos mató, nos hizo más fuertes*

AGRADECIMIENTOS

Al término de esta etapa de mi vida quiero expresar mis agradecimientos a quienes con su sabiduría, consejos y apoyo me alentaron a lograr mi meta:

A la Dra. Irma, por ser mi guía en este camino sinuoso. La maestría fue complicada y agotadora para mí, así que le agradezco no sólo por formarme académicamente sino por las lecciones de vida que me enseñó, sus consejos y apoyo incondicional. Le admiro, respeto y aprecio con el alma.

A la Dra. Zayil, por su paciencia, amabilidad y humor: virtudes difíciles de encontrar. Por todo el apoyo, disposición y dedicación brindada durante mi formación académica. Agradezco y admiro su calidad humana, le considero una amiga.

A la Dra. Leo por su paciencia y disposición para ayudarme a utilizar el citómetro de flujo y analizar mis resultados. Sus comentarios tan acertados hicieron posible la realización de este trabajo.

A la M en C. Ana Roa y al Dr. Fernando Lazcano por la revisión de esta tesis, por sus observaciones, consejos, recomendaciones y paciencia que me ayudaron a mejorar el presente trabajo. Sus aportaciones fueron muy importantes.

A la Dra. Reyna Fierro Pastrana y Dr. Humberto González-Márquez por aceptarme en su grupo de investigación, por sus sugerencias y recomendaciones. Gracias por permitirme crecer profesionalmente desde la licenciatura y ahora en la maestría.

A todos los integrantes de los laboratorios S-248, S-252 y S-255 por brindarme su apoyo cuando requerí su ayuda para realizar alguna técnica, utilizar alguno de los equipos o comprender información nueva para mí.

A mis compañeros del laboratorio, en especial a Oscar que siempre tuvo disposición para ayudarme en mis experimentos, por compartir conmigo sus conocimientos y por prestarme sus libros que me fueron de gran ayuda. A todos ellos, muchas gracias.

A Jesús Pineda por facilitarme la obtención de las muestras de semen en tiempo y forma que se requirió, por su amabilidad, por escuchar las recomendaciones para mejorar la calidad de las muestras y por su disposición de ayudar en cualquier momento. Su apoyo facilitó en gran medida la realización de este proyecto. Es una excelente persona.

Al Dr. Manuel Castillo, sus clases de bioestadística me ayudaron mucho en el análisis de mis resultados. Agradezco la oportunidad que me dio de ser su alumna y su paciencia para ayudarme a resolver mis dudas cuándo más lo necesité.

Un agradecimiento muy especial al Mto. En Biol. Exp. Enrique Mendieta Márquez, que en sus clases me mostró un mundo que no conocía. Ser su alumna y tratar de aprender lo más que pude de él ha sido para mí todo un honor.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	5
1.1	COMPUESTOS PERFLUORADOS	5
1.2	EFFECTOS DE LOS PFCs EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	6
1.3	MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE	7
1.4	MADURACIÓN EPIDIDIMARIA	10
1.5	IMPORTANCIA DEL Ca^{2+} EN LA FISIOLÓGÍA DEL ESPERMATOZOIDE	12
1.5.1	<i>Capacitación espermática</i>	13
1.5.2	<i>Exocitosis acrosomal o Reacción acrosomal</i>	16
1.5.3	<i>Canales de Ca^{2+} en el espermatozoide</i>	20
1.5.4	<i>Almacenes de Ca^{2+} intracelulares en el espermatozoide</i>	23
2	ANTECEDENTES	26
3	JUSTIFICACION	28
4	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
5	OBJETIVOS	28
5.1	GENERAL	28
5.2	PARTÍCULARES	28
6	HIPÓTESIS	29
7	MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1	OBTENCIÓN DEL SEMEN	30
7.2	EVALUACIÓN ESPERMÁTICA	30
7.3	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	31
7.4	EVALUACIÓN DE LA MUESTRA MEDIANTE CTC	32
7.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
8	RESULTADOS	34
8.1	DETERMINACIÓN DE LA CL ₅₀	34
8.2	DETERMINACIÓN DE LA CIC ₅₀	37

8.3 EFECTO DEL PFOA EN EL FLUJO DE Ca^{2+} I EVALUADO CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA	40
8.4 EFECTO DEL PFOA SOBRE LA MOVILIDAD DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	45
8.5 EFECTO DEL PFOA EN EL FLUJO DE Ca^{2+} I EVALUADO CON CITOMETRÍA DE FLUJO. .	46
8.6 EFECTO DEL PFOA EN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA EVALUADO CON CITOMETRÍA DE FLUJO	53
9 DISCUSIÓN	55
9.1 DETERMINACIÓN DE LA CL ₅₀	55
9.2 DETERMINACIÓN DE LA CIC ₅₀	56
9.3 EFECTO DEL PFOA EN EL FLUJO DE Ca^{2+} I EVALUADO CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA	57
9.4 EFECTO DEL PFOA EN LA MOVILIDAD DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	62
9.5 EFECTO DEL PFOA EN EL FLUJO DE Ca^{2+} I EVALUADO CON CITOMETRÍA DE FLUJO. .	65
9.6 EFECTO DEL PFOA EN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA EVALUADO CON CITOMETRÍA DE FLUJO.	67
10 CONCLUSIONES	72
11 PERSPECTIVAS.....	73
12 BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del espermatozoide de cerdo. A) Vista seccional del espermatozoide. Todas las líneas marcadas representan bicapas de membranas. 1) Membrana plasmática, 2) membrana acrosomal externa, 3) matriz de enzimas acrosomales, 4) membrana acrosomal interna, 5) envoltura nuclear, 6) núcleo, 7) anillo posterior y cuello, 8) mitocondria, 9) región proximal del flagelo, 10) anillo anular, 11) vaina fibrosa, 12) axonema y fibras densas externas. B) Vista superficial de la cabeza del espermatozoide y pieza media con los subdominios. 13) Anillo apical, 14) región pre-ecuatorial, 15) región ecuatorial, 16) región post-ecuatorial. C) Reacción acrosomal. 17) formación de vesículas híbridas entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. Nótese que la región ecuatorial no está implicada en la fusión de estas membranas (Gadella *et al.*, 2008). 9

Figura 2. Eventos moleculares básicos asociados a la capacitación. Uno de los eventos principales es la salida de colesterol de la membrana por su receptor molecular, por ejemplo la albumina, que activa al cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (nbc), que de forma simultánea, incrementa el pH intracelular y activa a adenil ciclasa soluble (SACY). La entrada de Ca^{2+} a través de CatSper también activa a SACY, este a su vez cataliza la producción cAMP, la cual activa a la proteína cinasa A (PKA). Entre las funciones de PKA es activar y mantener el influjo de Ca^{2+} a través de la activación de CatSper, activar a proteínas cinasas de tirosinas (PTK's) e inhibir la actividad de fosfatasa de proteínas (PP's). Modificado de (Signorelli *et al.*, 2012). 16

Figura 3. Posible cascada de señalización de la exocitosis acrosomal. La unión con la zona pelúcida (ZP) activa al menos a dos receptores: uno, al receptor acoplado a proteína G (R) que activa a $\text{PLC}\beta 1$ y puede regular la actividad de adenil ciclasa (AC), producir adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y activar a proteína cinasa A (PKA) y dos, al receptor de cinasa de tirosinas (TK) acoplada a $\text{PLC}\lambda$. La activación de ambas fosfolipasas catalizan la producción de inositol trifosfato (IP_3) y de diacilglicerol (DAG). PKA e IP_3 abren los canales de Ca^{2+} en la membrana acrosomal externa (OAM) y PKC activa los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (PM), que conduce al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la activación del mecanismo de salida de Ca^{2+} de los almacenes acrosomales (SOC). El incremento sostenido de Ca^{2+} activa a una proteína de ruptura de actina F (gelsolina) que rompe la barrera entre la PM y OAM. Las dos membranas son capaces de fusionarse y liberar el contenido acrosomal. Modificado de (Breitbart, 2002). 19

Figura 4. Posible ruta de transducción de señales del influjo de Ca^{2+} en espermatozoide de mamífero. Los canales de Ca^{2+} se localizan principalmente en la pieza principal del flagelo. El influjo de Ca^{2+} se regula principalmente por los canales CatSper, sin embargo, la interacción entre otros canales son responsables de la apertura de CatSper. Las diferentes moléculas representadas en el diagrama incluyen al cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), adenil ciclasa soluble (sACY), adenosín trifosfato (ATP), adenosín monofosfato cíclico (cAMP), guanosín monofosfato cíclico (cGMP), canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (CNG), canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos activado por hiperpolarización (HCN), zona pelúcida (ZP), canal de protones regulado por voltaje (Hv1), receptor de glutamato de la familia clase C (GPCRC) y mecanismo desconocidos (?) (Rahman *et al.*, 2014)..... 23

Figura 5. Efecto del PFOA en la viabilidad espermática en la capacitación y la RA *in vitro* con 100, 300 y 600 μM de PFOA. La viabilidad en la capacitación y RA se evaluaron con la tinción de Eosina-nigrosina, se analizaron 200 espermatozoides. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm \text{E.E}$) ($n=5$). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control $p<0.05$ 35

Figura 6. Efecto de PFOA a 190, 478 y 950 μM en la viabilidad espermática en la capacitación y la RA *in vitro*. La viabilidad en capacitación y RA se evaluó con la tinción de Eosina-nigrosina, se analizaron 200 espermatozoides. El PFOA a 950 μM de PFOA provoca disminución significativa en la viabilidad espermática en la RA. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm \text{E.E}$) ($n=5$). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$)..... 36

Figura 7. Patrones de fluorescencia. Fotografías con microscopía de fluorescencia, magnificación 400x. Patrones de tinción con clorotetraciclina (CTC). Patrón 1) espermatozoides no capacitados, patrón 2 y 3) espermatozoides capacitados y, patrón 4 y 5) espermatozoides reaccionados..... 38

Figura 8. Patrones de tinción con el indicador de Ca^{2+} Fluo -3 AM. Fotografías con microscopía de fluorescencia, magnificación 400x. Se consideraron los patrones 1, 2 y 3 como espermatozoides no capacitados; al patrón 4 como espermatozoides capacitados y al patrón 5 como espermatozoides reaccionados..... 41

Figura 9. Efecto de 190, 478 y 950 μM de PFOA en el porcentaje de espermatozoides capacitados (de acuerdo con el patrón de tinción 4) en la capacitación y RA *in vitro*. PFOA provocó

disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados en la capacitación y RA. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm E.E$) ($n=5$). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$), +Diferencias vs. control ($p<0.05$). 43

Figura 10. Efecto de PFOA en el porcentaje de espermatozoides reaccionados (de acuerdo al patrón de tinción 5) en la capacitación (RA espontánea) y la RA (RA inducida) *in vitro*. El PFOA provocó incremento de los espermatozoides reaccionados en ambos procesos. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm E.E$) ($n=5$). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$), +Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$). 45

Figura 11. Poblaciones de espermatozoides determinadas con el indicador de Ca^{2+} Fluo-3 AM analizados con citometría de flujo. A) Autofluorescencia o control negativo a Fluo-3 AM, B) control positivo a Fluo-3 AM en espermatozoides sin capacitar, C y D) control positivo a Fluo-3 AM en espermatozoides capacitados y reaccionados. M1, región de autofluorescencia o control negativo, M2 y M3, poblaciones de espermatozoides con diferente flujo de Ca^{2+} 48

Figura 12. Índice de Fluorescencia (IF) en espermatozoides control sin capacitar, capacitados y reaccionados, teñidos con Fluo-3 AM. M1) Autofluorescencia, M2 y M3) poblaciones de espermatozoides con flujo de Ca^{2+} diferente. En espermatozoides sin capacitar sólo se forma M2, la cual es una población de espermatozoides con Ca^{2+} bajo, mientras que en capacitados y reaccionados se forman las poblaciones M2 y M3, donde M3 representa una población de espermatozoides con incremento de Ca^{2+} . Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm E.E$) ($n=5$). 49

Figura 13. Índice de Fluorescencia (IF) en espermatozoides capacitados *in vitro* con PFOA. M2) grupo de espermatozoides no capacitados, presentan poco Ca^{2+} , M3) grupo de espermatozoides capacitados y reaccionados, presentan incremento de Ca^{2+} . PFOA no induce cambios en el Ca^{2+} de la población M2, sin embargo, PFOA induce disminución del Ca^{2+} en M3 con la concentración más alta. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm E.E$) ($n=5$). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Bonferroni. *Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$). 51

Figura 14. Índice de Fluorescencia (IF) en espermatozoides reaccionados *in vitro* con PFOA. M2) grupo de espermatozoides no capacitados, presentan poco Ca^{2+} , M3) grupo de

espermatozoides capacitados y reaccionados, presentan incremento de Ca^{2+}_i . El PFOA a 950 μM induce incremento del Ca^{2+}_i en la población M2, mientras que en la población M3 el PFOA provocó disminución del Ca^{2+}_i , ambos de forma significativa. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm \text{E.E.}$) ($n=5$). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$), +Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$)..... 52

Figura 15. Posible participación de PFOA en el incremento de Ca^{2+}_i en capacitación espermática. La albúmina sérica de bovino (BSA) del medio extracelular puede formar complejos con PFOA, que podrían inhibir el efecto tóxico del PFOA. El PFOA por ser una molécula anfifílica podría atravesar libremente la membrana plasmática y provocar diversos efectos (ver más adelante). El PFOA puede provocar cambios en el potencial de membrana que podría activar diferentes canales iónicos dependientes de voltaje (señalados con flechas rosas) como el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), el canal de potasio específico de espermatozoides (SLO3) y el canal de protones regulado por voltaje (Hv1), estos últimos provocan incremento del pH intracelular (pH_i) y cambios en el potencial de membrana que inducen la activación del principal canal de Ca^{2+} , CatSper que mantiene el influjo sostenido de Ca^{2+} durante la capacitación; asimismo PFOA podría inducir el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de la activación del Ca^{2+} regulado por voltaje tipo-L (L-VGCC). Durante la capacitación espermática el incremento del pH_i y de Ca^{2+}_i activan a adenilato ciclasa soluble (sAC) que produce a adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que junto con guanosín monofosfato cíclico (GMPc) activan al canal de Ca^{2+} regulado por nucleótidos cíclicos (CNG), el cual también permite el influjo de Ca^{2+} extracelular; este último activa al canales iónico regulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN). AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA) que se encuentra en ligado a la proteína de anclaje a proteína cinasa A (AKAP) y participan en la fosforilación de proteínas cinasas de tirosinas (PTK), la cual fosforila en residuos de tirosinas de proteínas involucradas en el movimiento hiperactivado en la capacitación; de igual forma PKA participa en la activación de CatSper. Por otra parte, la mitocondria en la capacitación produce especies reactivas de oxígeno (ROS), asimismo PFOA a través del incremento de Ca^{2+} , podría favorecer la producción de ROS y favorecer la capacitación mediante la fosforilación de proteínas. Modificado de (Rahman *et al.*, 2014). 69

Figura 16. Posible participación de PFOA en el incremento de Ca^{2+}_i en la RA. En la RA la unión de la ZP3 a su receptor induce el incremento del pH intracelular (pH_i) y de Ca^{2+}_i a través de la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Cav) que mantienen el influjo de Ca^{2+} extracelular sostenido en la RA. El PFOA podría activar diversos canales iónicos

dependientes de voltaje a través de cambios en el potencial de membrana como al canal Cav y canales de Na⁺ (señalados con flechas rosas). Asimismo el incremento de Ca²⁺_i y la activación de la proteína Gq activan a PLC que hidroliza a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para producir inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ se une a su receptor (IP₃R) en la membrana acrosomal externa e induce la movilización del Ca²⁺_i almacenado en el acrosoma; de igual forma, PFOA podría activar al IP₃R y al receptor de rianodina (RyR) a través de cambios en el potencial de membrana e inducir el incremento de Ca²⁺_i debido a la salida de Ca²⁺ del acrosoma y a la activación de los canales de Ca²⁺_i operados por el almacén (SOC). A su vez, el incremento de Ca²⁺_i activa a las proteínas involucradas en la fusión de membranas en la RA como las proteínas SNARE. Las concentraciones bajas de Ca²⁺ dentro del acrosoma se regulan por la ATPasa de Ca²⁺ del retículo endoplasmático (SERCA) que mantiene el influjo de Ca²⁺ hacia dentro del acrosoma durante el proceso de RA. Modificado de (Darszon et al., 2011). 70

ABREVIATURAS

PFCs	Compuestos perfluorados
PFHxS	Ácido perfluorohexanosulfónico
PFOS	Ácido perfluorooctanosulfónico
PFOA	Ácido perfluorooctanoico
PFDA	Ácido perfluorodecanóico
PFNA	Ácido perfluorononanoico
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente
Ca²⁺_i	Calcio intracelular
[Ca²⁺]_i	Concentración de Ca ²⁺ intracelular
ZP	Zona pelúcida
PM	Membrana plasmática
OAM	Membrana acrosomal externa
LTF	Lactoferrina
LCN5	Lipocalina 5
CLU	Clusterina
GPX5	Glutation peroxidasa
PRGDS	Prostaglandina D2 sintasa
TF	Transferrina
PEBP4	Proteína de unión a fosfoetanolamina 4
HEXB	β-N-acetil-hexaminidasa
GST	Glutation-S-transferasa
GSN	Gelsolina
GLB1	β-galactosidasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
CatSper	Canales de Ca ²⁺ específicos del espermatozoide
Ca_vs	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
TRP	Receptor potencial transitorio
CNG	Canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos

HCN	Canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización
sAC	Adenil ciclasa soluble única específica del espermatozoide
AC	Adenil ciclasa
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PTK	Proteínas cinasas de tirosinas
PP's	Fosfatasas de proteínas
AKAP's	Proteínas ancladas a proteína cinasa A
RA	Reacción acrosomal
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
IP₃	Inositol trifosfato
IP₃R	Receptor de inositol trifosfato
PLC	Fosfolipasa C
DAG	Diacilglicerol
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
BSA	Albúmina sérica de bovino
TRCP	Receptores potenciales transitorios canónicos
Hv1	Canales de protones regulados por voltaje
SERCA	Bombas ATPasa del retículo endoplasmático
Ry	Rianodina
RyR	Receptor de rianodina
CaM	Calmodulina
PDE	Fosfodiesterasa
MCU	Canales de Ca ²⁺ uniport de la mitocondria
CL₅₀	Concentración letal 50
CIC₅₀	Concentración de inhibición de la capacitación 50
E-N	Eosina-nigrosina

PBS	Solución salina de fosfatos
CTC	Clorotetraciclina
IF	Índice de Fluorescencia
SOC	Mecanismo de entrada de Ca^{2+} operado por el almacén
CICR	Mecanismo de liberación de calcio inducido por Ca^{2+}
mKRB	Medio de bicarbonato Krebs-Ringer modificado
PSA	Albúmina sérica de porcino
MBC	Metil-beta-ciclodextrina

RESUMEN

El ácido perfluorooctanoico (PFOA) es un compuesto antropogénico contaminante, no degradable y bioacumulable que se ha utilizado por varios años en diferentes industrias. Existen reportes que indican los diversos efectos tóxicos de los perfluorados, incluido el PFOA, en los sistemas biológicos, que incluyen desde disminución de la fertilidad y conteo espermático hasta efectos en la homeostasis del Ca^{2+} en neuronas. En los espermatozoides, el Ca^{2+} es una molécula muy importante que participa en los procesos fisiológicos de la capacitación y reacción acrosomal (RA). El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del PFOA en el flujo de Ca^{2+} en la capacitación y RA del espermatozoide.

Se determinó una CL_{50} teórica de 950 μM de PFOA y se consideraron a 478 y 190 μM como las $\text{CL}_{50/2}$ y $\text{CL}_{50/5}$, respectivamente. Sin embargo, 950 μM PFOA no fue letal para la mitad de la población expuesta a PFOA. En la movilidad no se observaron cambios en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados, no obstante, se observó disminución del porcentaje y tamaño de aglutinados (60%) de forma dosis-dependiente. Asimismo con CTC, se observó que con PFOA (950 μM) se mantuvo un alto porcentaje de espermatozoides capacitados (85%) y reaccionados (19%). Al evaluar el efecto del PFOA en el flujo Ca^{2+} con el indicador fluorescente Fluo-3 AM durante la capacitación y RA, fue posible determinar 5 patrones con base en los que se determinó que a 950 μM de PFOA hubo una disminución en el porcentaje de espermatozoides capacitados (54%) y un incremento de los reaccionados (49%).

Con citometría de flujo se determinaron tres poblaciones espermáticas: M1, M2 y M3; considerando M2 como espermatozoides no capacitados y M3 como capacitados y reaccionados. Con base en lo anterior, en la capacitación se observó disminución del índice de fluorescencia (IF), es decir del flujo de Ca^{2+} , de 28,636 a 20,116 en M3 con 950 μM PFOA. Asimismo, el IF en M3 en la RA inducida con 950 μM de PFOA disminuyó de 29,131 a 12,743 paralelo a un incremento en M2 de 6,415 a 15,153 en M2.

Aunque no fue posible determinar la CL_{50} real, con CTC se observó que el PFOA mantiene la capacitación y la RA, pero CTC es un indicador de Ca^{2+} de la membrana plasmática del espermatozoide, por lo que el uso de Fluo-3 AM proporcionó más información indicando una disminución en el porcentaje de espermatozoides capacitados debido al incremento de los reaccionados en presencia de PFOA, debido quizá a una movilización de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y del acrosoma que promovió y aceleró la RA o bien un influjo de Ca^{2+} a través de la activación de canales de Ca^{2+} tipo-L por cambios en el potencial de membrana, además de la posible producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que también promueven la capacitación y RA. Asimismo, la desaglutinación de los espermatozoides, que es un indicador de capacitación, muestra que el PFOA posiblemente aceleró la capacitación.

Contrario a las células somáticas donde el incremento no regulado de Ca^{2+} por PFOA puede ser letal para éstas, en espermatozoides estimuló la capacitación y RA, sin embargo, la aceleración de la RA espontánea e inducida en presencia de PFOA mostró que este compuesto podría comprometer la capacidad fertilizante del espermatozoide por lo que se requieren más estudios para un mejor entendimiento del mecanismo de acción del PFOA en la regulación del Ca^{2+} en el proceso de capacitación y RA del espermatozoide.

ABSTRACT

Perfluorooctanoic acid is a bioaccumulative anthropogenic pollutant, resistant to environmental degradation, which has been used for many years on the industry. Several reports point the toxic effects of PFOA at different biological levels, including the diminish of fertility and sperm count, until homeostasis alteration of Ca^{2+} in neurons. In sperm cells, Ca^{2+} plays a vital role on the capacitation and the Acrosomal Reaction (AR), both process involved on sperm maturation and therefore on fertilization. The aim of this study was to determine the effect of PFOA on Ca^{2+} mobilization during capacitation and AR on boar sperm.

The theoretical PFOA LC_{50} was 950 μM ; 478 μM and 190 μM were considered as $\text{LC}_{50/2}$ y $\text{LC}_{50/5}$, respectively. However when LC_{50} was tested it did not show to be lethal for half of the cell population exposed to PFOA. In respect to motility, the percentage of hyperactivated spermatozoa did not change although there was a diminish on the percentage and size of agglutination on a dose dependent manner being 60% at 950 μM .

With CTC it was observed that, with PFOA at 950 μM , capacitation and spontaneous AR were kept at 85% and 19% respectively. But, based on 5 patterns of sperm fluorescence obtained with Fluo-3 AM, which is a fluorescent calcium indicator, PFOA 950 μM decreased capacitation to 54% whereas increased AR to 49%.

By flow cytometry three sperm populations were found: M1, M2 and M3; M2 was considered as non capacitated spermatozoa while M3 was considered as reacted and capacitated spermatozoa. Based on this, during capacitation in the presence of PFOA 950 μM on M3 there was a decrease on Fluo3-AM fluorescence, that is Ca^{2+} , from 28,636 to 20,116. Likewise when the AR was induced with 950 μM of PFOA, Fluo-3 AM fluorescence diminished from 29,131 to 12,743 while at the same time, there was a rise on Fluo-3 AM on M2 from 6,415 to 15,153.

Although it was not possible to find the real LD_{50} , with CTC it was observed that PFOA keeps the rate of capacitation and AR, however CTC indicates the Ca^{2+} on the

sperm membrane. When Fluo-3 AM was used, it gave more information and showed a decrease on capacitation because of a rise on reacted spermatozoa when PFOA was present. This could be explained by the exit of Ca^{2+} from the cellular storages and acrosome that promoted and accelerated the AR, or by an influx of Ca^{2+} through type-L Ca^{2+} channels activated by changes on membrane potential. Also the production reactive oxygen species (ROS) could promote capacitation and accelerate AR. Likewise, with PFOA it was observed a decrease on agglutination that indicates that capacitation is happening, which reinforces that PFOA was promoting sperm capacitation.

In contrast to somatic cells, where a non regulated increase of Ca^{2+}_i by PFOA can be lethal, on spermatozoa the PFOA stimulated capacitation and AR, although the rise on spontaneous or induced AR, when PFOA was present during capacitation indicates that this perfluorinated compound could compromise the capacity of the sperm to fertilize. More studies are necessary for a better understanding of PFOA mechanisms on Ca^{2+}_i regulation during capacitation and AR on the sperm.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Compuestos perfluorados

Los compuestos perfluorados (PFCs) son productos químicos antropogénicos que se han incorporado a una amplia gama de productos en las últimas seis décadas (Lindstrom *et al.*, 2011). El pico máximo de producción de los PFCs sucedió entre 1970 y 2002, generándose en ese intervalo de tiempo aproximadamente 96,000 toneladas (Paul *et al.*, 2009). Estos compuestos son comúnmente utilizados en diversas industrias como la industria textil, eléctrica, automotriz, de construcción, entre otras, debido a que confieren resistencia al fuego y repelencia al aceite, al agua y a la tinción. De acuerdo con su composición química, los PFCs se subdividen en dos categorías:

Perfluoroalquil-sulfonatos, entre los que se encuentran el ácido perfluorohexanosulfónico (PFHxS, con fórmula $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_5\text{-SO}_3\text{H}$) y el ácido perfluorooctanosulfónico (PFOS, con fórmula $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-SO}_3\text{H}$).

Perfluoroalquil-carboxilatos, entre los que se encuentra el ácido perfluorooctanoico (PFOA, con fórmula $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_6\text{-COOH}$) y el ácido perfluorodecanoico (PFDA, con fórmula $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_8\text{-COOH}$).

Ambas categorías son compuestos estables con gran resistencia térmica, química y biológica y, por lo mismo, son bioacumulables. Son sustancias anfífilas, es decir, se pueden disolver en agua y aceites. Por sus propiedades, se utilizan en la producción de una multitud de productos de uso común como cosméticos, productos textiles, revestimientos antiadherentes e impermeabilizantes, productos quitamanchas, productos de limpieza, fitosanitarios, entre otros (OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 2005).

En particular, el ácido perfluorooctanoico (PFOA) es un compuesto fluoroquímico orgánico que se ha utilizado desde los años 50. Es un derivado del ácido octanoico,

en el cual se substituyen todos sus hidrógenos alifáticos por moléculas de flúor (Kudo y Kawashima, 2003). Aunque no es preciso, se estima que la producción del PFOA es de 500 toneladas por año (Lau *et al.*, 2004).

1.2 Efectos de los PFCs en los sistemas biológicos

Se ha reportado que los PFCs producen diversos efectos incluyendo la proliferación de los peroxisomas, hepatomegalia, hiperplasia, hepatocarcinogénesis (Sohlenius *et al.*, 1994, 1993) al igual que proliferación hepatocítica (Vanden Heuvel, 1999). También, los PFCs afectan la comunicación celular a través de las uniones comunicantes (Upham *et al.*, 1998) y se asocian con la despolarización del potencial de membrana (Kleszczyński y Składanowski, 2009). Aunque pertenecientes a diferentes categorías, varios estudios en animales han propuesto que el PFOA y el PFOS actúan como disruptores endócrinos (Joensen *et al.*, 2009). Por ejemplo, la exposición a altas concentraciones de PFOA, se asocian con la disminución de los niveles de testosterona y el aumento de los niveles de estradiol en ratas adultas (Biegel *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1992), mientras que en ratones hembras prepúberes, se asocia con niveles altos de progesterona (Zhao *et al.*, 2010). Además, el PFOA induce la formación de tumores en testículo, hígado y páncreas en roedores (Biegel *et al.*, 2001) y probablemente, también incrementa la formación de tumores de mama. Por otro lado, induce la disminución del peso de las crías de ratón y causa muerte neonatal en crías de rata (Lau *et al.*, 2007).

Respecto al metabolismo del PFOA, en ratas se absorbe con facilidad en el tracto gastrointestinal y se excreta principalmente a través del riñón (Andersen *et al.*, 2008), sin embargo, en el cuerpo humano no es metabolizado y no se conoce su distribución en el tejido. En ratas se ha demostrado que el PFOA persiste en el hígado, riñón y plasma sanguíneo a concentraciones de 4 ng/mL (Kennedy *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2007). Asimismo, se reportó que en algunas poblaciones estadounidenses la concentración del perfluorooctanato (molécula disociada del PFOA) en el plasma sanguíneo es de 4 ng/mL (Calafat *et al.*, 2007).

Hasta el momento se sabe que la vida media del PFOA varía entre especies (Lindstrom *et al.*, 2011). En ratas hembras es de aproximadamente 4 horas, mientras que en ratas machos es de 6 días. En contraste, en humanos, la vida media del PFOA es de 3.4 años (Olsen *et al.*, 2007). Hasta la fecha no se conoce con exactitud la fuente principal de exposición en humanos, sin embargo, se sugiere que en poblaciones estadounidenses la fuente principal de contaminación es a través del agua potable (Emmett *et al.*, 2006; Hölzer *et al.*, 2008; Steenland *et al.*, 2009) y el riesgo de contaminación de la población aumenta en ciudades industrializadas (Fromme *et al.*, 2009; Kannan *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2007).

Es por ello que, tomando en cuenta su permanencia en el medio ambiente y los efectos potenciales en la salud, la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) de los EE.UU, ha advertido que la ingesta de PFOA (400 ng/L) y de PFOS (200 ng/L) en agua potable, puede comprometer la salud pública (EPA., 2009).

Adicional a los efectos biológicos previamente mencionados, existen reportes que indican que la presencia del PFOA y de PFOS en cultivos de neuronas promueven la salida del Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+i}) de los almacenes de las neuronas, incrementando así la concentración del Ca^{2+} en el medio de cultivo (Liao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011).

1.3 Morfología del espermatozoide

El espermatozoide es el gameto masculino que participa en el proceso de fertilización. El espermatozoide maduro de los mamíferos es una célula haploide, de morfología variada entre especies, mide aproximadamente 60 μm de longitud y está compuesto básicamente por dos partes funcionales: la cabeza y el flagelo o cola (Figura 1A). Los espermatozoides se forman en los testículos (espermatogénesis), continúan con su maduración espermática en el epidídimo (maduración epididimaria) y finalmente, en el tracto reproductor femenino, adquieren su capacidad fertilizante a

través de la activación de cascadas de señalización que le permiten adquirir movilidad hiperactivada y ser reconocido por el ovocito.

La cabeza contiene un núcleo altamente condensado y un acrosoma en la región apical, la cual es una vesícula que contiene enzimas hidrolíticas que degradan la zona pelúcida (ZP) del ovocito, durante la fertilización. La superficie de la cabeza presenta heterogeneidad tanto en la composición lipídica y proteínica, como en la formación de compartimentos en la membrana plasmática (PM, siglas en inglés) de la cabeza donde se pueden identificar cuatro regiones: la región del anillo apical, el área de la superficie pre-ecuatorial, la región ecuatorial y la región post-ecuatorial (Figura 1B) (Gadella *et al.*, 2008). Cabe señalar que cada región de la cabeza del espermatozoide cumple con funciones específicas durante el proceso de fertilización. Por ejemplo, la región apical contiene glicoproteínas que están implicadas en el proceso de reconocimiento y unión con la ZP del ovocito (O'Rand y Fisher, 1987). Una vez que el espermatozoide se une a la ZP del ovocito, se induce la formación de vesículas híbridas entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (OAM, siglas en inglés) que resulta en la liberación de las enzimas acrosomales que degradan a la ZP (Figura 1C) (Yanagimachi, 1994).

El flagelo por su parte, está dividido en tres regiones funcionales: la pieza media, que contiene a las mitocondrias, la pieza principal, donde se encuentran la mayoría de los canales iónicos y la pieza final (figura 1A). El flagelo le proporciona movilidad al espermatozoide, y éste cambia a través de su recorrido por el tracto reproductor femenino. Es así que en la capacitación espermática, se activan diferentes canales iónicos, de forma coordinada, que permiten el cambio en el patrón de movimiento del flagelo que se caracteriza por ser un movimiento asimétrico de ondas amplias, comúnmente conocido como hiperactivación (Miller *et al.*, 2015).

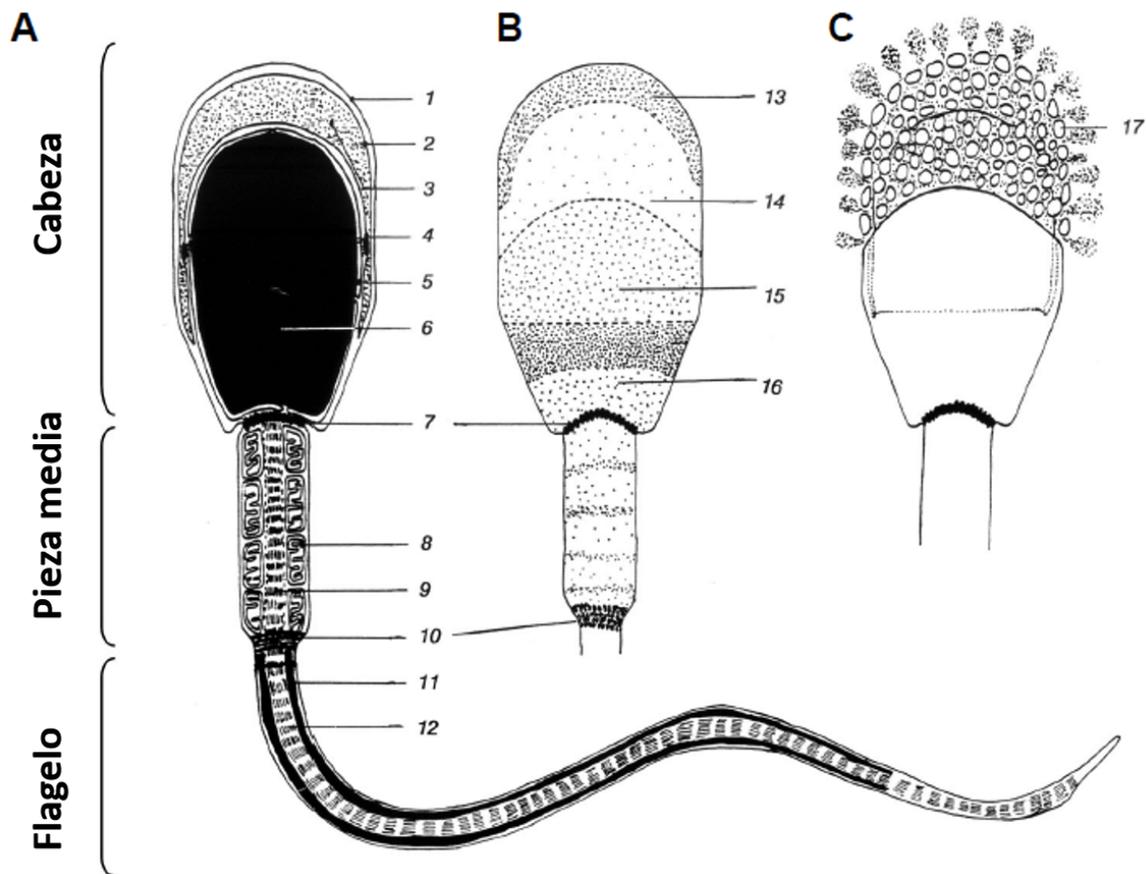


Figura 1. Representación esquemática del espermatozoide de cerdo. A) Vista seccional del espermatozoide. Todas las líneas marcadas representan bicapas de membranas. 1) Membrana plasmática, 2) membrana acrosomal externa, 3) matriz de enzimas acrosomales, 4) membrana acrosomal interna, 5) envoltura nuclear, 6) núcleo, 7) anillo posterior y cuello, 8) mitocondria, 9) región proximal del flagelo, 10) anillo anular, 11) vaina fibrosa, 12) axonema y fibras densas externas. B) Vista superficial de la cabeza del espermatozoide y pieza media con los subdominios. 13) Anillo apical, 14) región pre-ecuatorial, 15) región ecuatorial, 16) región post-ecuatorial. C) Reacción acrosomal. 17) formación de vesículas híbridas entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. Nótese que la región ecuatorial no está implicada en la fusión de estas membranas (Gadella *et al.*, 2008).

1.4 Maduración epididimaria

Los espermatozoides son células diferenciadas que se han formado por una secuencia de eventos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos a través de su paso por el testículo y el epidídimo. En los túbulos seminíferos del testículo, las células germinales darán lugar a los espermatozoides mediante una serie de modificaciones celulares, genéticamente controladas a través del tiempo conocido como “espermatogénesis”. Los espermatozoides formados en el testículo son células morfológicamente completas pero inmóviles, sin actividad transcripcional y traduccional e incapaces de fertilizar al ovocito. Al pasar por las diferentes regiones del túbulo epididimario experimentan nuevas modificaciones conocidas como “maduración espermática epididimaria” (Dacheux y Dacheux, 2014).

El epidídimo, que es un tubo largo y estrecho conectado con los túbulos seminíferos del testículo a través de los conductos eferentes, ubicado en la parte superior del testículo, se divide en tres regiones; cabeza, cuerpo y cola. Cuando los espermatozoides testiculares se han formado en los túbulos seminíferos son transportados a través de la rete testis y de los ductos eferentes hacia la cabeza del epidídimo (Dacheux y Dacheux, 2014).

El transporte de los espermatozoides se facilita por la presión generada por los espermatozoides producidos, las secreciones de los fluidos producidos por las células de Sertoli y la rete testis, las contracciones dentro de la cápsula testicular y la capa mioide del túbulo seminífero en el testículo y por el movimiento de las células epiteliales ciliadas de los ductos eferentes (Ilio y Hess, 1994). Ya en el epidídimo, los espermatozoides permanecen una o dos semanas y conforme avanzan a lo largo del túbulo las condiciones microambientales van cambiando y con ello, modificando los componentes moleculares de la superficie membranal del espermatozoide (Dacheux y Dacheux, 2014).

Uno de las principales modificaciones en la primera región del epidídimo es la reabsorción de agua que es regulada por acuaporinas y por el movimiento de iones

de Na^+ , Cl^- y HCO_3^- que resultan de la modificación en la composición iónica del fluido luminal en el epidídimo (Da Silva *et al.*, 2006). La reducción del volumen del fluido luminal en el epidídimo favorece el incremento de la concentración de espermatozoides y de proteínas. Muchas de estas proteínas son procesadas a lo largo del tránsito por el túbulo epididimario y están involucradas en la capacidad de unión del espermatozoide con el ovocito. Es en la región principal del epidídimo donde ocurren los cambios más importantes en la composición proteínica de la membrana del espermatozoide (Belleannee *et al.*, 2011; Dacheux *et al.*, 2012; Fouchécourt *et al.*, 2002).

En el fluido epididimal de varias especies se han identificado cientos de proteínas que son secretadas por el epitelio del epidídimo y cambian con las diferentes regiones del epidídimo. Entre las proteínas más comunes, se encuentran lactoferrina (LTF), lipocalina 5 (LCN5, E-RAPB), clusterina (CLU), glutación peroxidasa (GPX5), prostaglandina D2 sintasa (PRGDS), transferrina (TF), proteína de unión a fosfoetanolamina 4 (PEBP4), β -N-acetil-hexaminidasa (HEXB), glutación-S-transferasa (GST), gelsolina (GSN), actina y β -galactosidasa (GLB1) (Dacheux y Dacheux, 2014).

Entre las funciones que realizan son: protección del espermatozoide a través de su paso por el epidídimo mediante la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) (Chabory *et al.*, 2010), protección de los sitios activos de las proteínas de la PM del espermatozoide (Fàbrega *et al.*, 2012) e intercambio molecular de componentes hidrofóbicos en la membrana del espermatozoide (Guyonnet *et al.*, 2012).

Las modificaciones más relevantes de la maduración espermática epididimaria son: 1) eliminación de la gota citoplasmática, la cual es un remanente del proceso de espermatogénesis e inhabilita al espermatozoide para adquirir una movilidad adecuada (Cooper, 2005) y 2) adición de proteínas epididimarias en regiones específicas de la membrana plasmática del espermatozoide, mediante interacciones

electrostáticas y epididimosomas, que lo preparan para la capacitación, reacción acrosomal y fertilización del ovocito en el tracto reproductor femenino (Dacheux y Dacheux, 2014).

1.5 Importancia del Ca^{2+} en la fisiología del espermatozoide

El Ca^{2+} es un segundo mensajero reconocido desde hace tiempo (Berridge, 2009; Carafoli *et al.*, 2001). Está involucrado en la regulación de varias funciones celulares importantes, como la secreción, la excitación-contracción, la transcripción de genes, la movilidad, la actividad de enzimas y el transporte, el estado de fosforilación de proteínas, así como en diversas formas de muerte celular (Carafoli *et al.*, 2001; Darszon *et al.*, 2005).

Asimismo, el Ca^{2+} es crítico en diferentes procesos de señalización celular y actúa en diversos espacios celulares: mitocondria, retículo endoplasmático y citoplasma. Para cumplir con estas funciones, la concentración de Ca^{2+} debe ser regulada tanto intra como extracelularmente; la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se mantiene dentro de los límites a través de una variedad de mecanismos celulares que amortiguan, secuestran, liberan y acumulan el Ca^{2+} , con cambios de concentración que ocurren a menudo en zonas muy localizadas dentro de la célula (Carafoli *et al.*, 2001).

En los espermatozoides de invertebrados y vertebrados, el Ca^{2+} es fundamental en la fertilización ya que participa en las funciones principales del espermatozoide, como lo es la maduración epidídima, la movilidad y la exocitosis acrosomal (Yanagimachi, 1994). Adicional a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el pH intracelular y el potencial de membrana son regulados por canales iónicos y transportadores que juegan un papel muy importante en la sobrevivencia y fertilidad espermática (Miller *et al.*, 2015).

En los últimos 10 años debido a los avances en las herramientas disponibles para estudiar la fisiología de los espermatozoides y el proceso de fertilización, se ha establecido la importancia fundamental de los canales iónicos de Ca^{2+} , ya que al

bloquearlos se inhiben sus procesos fisiológicos, principalmente la fertilización (Darszon *et al.*, 2007; Florman *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2008; Publicover *et al.*, 2007).

1.5.1 Capacitación espermática

Los espermatozoides a pesar de ser células totalmente diferenciadas, son incapaces de fertilizar al ovocito. Para lograrlo, requieren de una última maduración dentro del tracto reproductor femenino conocido como “capacitación”. La capacitación espermática es una serie de eventos bioquímicos y fisiológicos, que permiten al espermatozoide fosforilar proteínas, adquirir un nuevo patrón de movimiento del flagelo, conocido como hiperactivación y remodelar la composición molecular de su PM para reconocer y fecundar al ovocito (Yanagimachi, 1994).

La capacitación es un proceso orquestado en el que participan varias cascadas de señalización de forma paralela, que ocurren tanto en la cabeza (preparación para la exocitosis acrosomal) como en el flagelo (hiperactivación) (Signorelli *et al.*, 2012). Recientemente, la capacitación se ha dividido en dos eventos: 1) eventos rápidos o tempranos y 2) eventos lentos o tardíos (Ickowicz *et al.*, 2012; Signorelli *et al.*, 2012).

Los eventos rápidos dan inicio tan pronto como los espermatozoides dejan el epidídimo y se depositan en el tracto reproductor femenino e implica la activación del movimiento asimétrico del flagelo. Inicia con el incremento de HCO_3^- a través del cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Demarco *et al.*, 2003) y el incremento de Ca^{2+} a través de los diferentes canales de Ca^{2+} presentes en el espermatozoide como CatSper, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v s), el receptor potencial transitorio (TRP), canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (CNG) y canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN) (Rahman *et al.*, 2014).

El incremento de HCO_3^- y de Ca^{2+} intracelular provocan el incremento del pH intracelular y la activación de una adenil ciclasa soluble única (Adcy10, aka, sAC y

SACY), específica del espermatozoide (Buffone *et al.*, 2014). Una característica importante de esta sAC es que se activa únicamente por HCO_3^- y Ca^{2+} y no por la activación de proteínas G o foscolina, como sucede con la mayoría de las isoformas de AC (Chaloupka *et al.*, 2006; Jaiswal y Conti, 2003).

El incremento de HCO_3^- , provoca un cambio rápido en la composición lipídica de la PM a través de la activación de enzimas escramblasas que translocan fosfolípidos, como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, desde la cara interna hacia la cara externa de la membrana (Gadella y Harrison, 2000) e incrementa la disponibilidad de colesterol a aceptores externos como albúmina, ciclodextrinas o fosfolípidos de alta densidad. Al mismo tiempo, la sAC cataliza la formación rápida (pico máximo dentro de los primeros 60 s) de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), la cual activa a la proteína cinasa A (PKA). La actividad de PKA ocurre dentro de los primeros 90 s que inicia la capacitación (Salicioni *et al.*, 2007). PKA es una cinasa de residuos de Ser/Tre que tiene como sustrato una gran variedad de proteínas implicadas en la capacitación espermática por ejemplo, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, cinasas de tirosinas, fosfatasas y proteína cinasa C (PKC), entre otras (Ickowicz *et al.*, 2012).

Los eventos lentos inician con la salida del colesterol que incrementa la fluidez de membrana y mantiene elevada la concentración de HCO_3^- que activa a la vía de las ACs/cAMP/PKA. Los eventos lentos de la capacitación implican el cambio en el patrón de movimiento del flagelo (hiperactivación), a través de la fosforilación de residuos de tirosinas de proteínas que dependen de la activación de PKA (Visconti *et al.*, 1999).

Durante esta fase, PKA mantiene fosforilados a los canales de Ca^{2+} específicos de espermatozoide, los canales CatSper, que se encuentran específicamente en la pieza principal del flagelo e inducen el influjo de Ca^{2+} sostenido durante el proceso de capacitación. Al mismo tiempo, PKA actúa como activador de proteínas cinasas de tirosinas (PTK), que incluye a miembros de la familia Src (SRC, FYN, LYN, y

YES1), y como inhibidor de fosfatasa de proteínas (PP's) (Signorelli *et al.*, 2012). Las principales proteínas que son fosforiladas en residuos de tirosinas se encuentran en la vaina fibrosa del flagelo y pertenecen a la familia de proteínas ancladas a proteína cinasa A (AKAP's) y que tienen gran importancia en la adquisición del movimiento hiperactivado (Ficarro *et al.*, 2003).

Otro de los eventos relevantes en la capacitación espermática es la polimerización de actina F (Brenner *et al.*, 2003). La polimerización de actina se regula por el incremento de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), un fosfolípido importante de la PM que unido a gelsolina, una proteína globular que participa en el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina, inhibe la separación de los filamentos recién ensamblados y evita el recubrimiento los extremos de ensamblaje de la actina. En la capacitación, la gelsolina se transloca desde el flagelo a la cabeza del espermatozoide y se mantiene inactiva a través de su unión con PIP₂ para promover la polimerización de actina F en la cabeza, la cual se asocia a la preparación del espermatozoide para la exocitosis acrosomal, mientras que la disminución de gelsolina en el flagelo permite el incremento de actina F que se asocia a la adquisición del movimiento hiperactivado, sin embargo, la participación de gelsolina en la movilidad espermática no es completamente comprendido (Brenner *et al.*, 2003; Finkelstein *et al.*, 2013).

Además de la inhibición de gelsolina a través de la unión con PIP₂, gelsolina se inhibe por fosforilaciones en tirosinas (Tyr 438) durante la capacitación (Finkelstein *et al.*, 2010). La fosforilación en tirosinas es dependiente de la unión de gelsolina con PIP₂ y se regula por cinasas de la familia SRC, las cuales además sensibilizan a gelsolina para ser degradada (Finkelstein *et al.*, 2013).

Todos estos eventos permiten que el espermatozoide en la capacitación: 1) pueda llevar a cabo la exocitosis acrosomal, 2) adquiera movimiento hiperactivado y 3) sea capaz de reconocer y fecundar al ovocito (Figura 2).

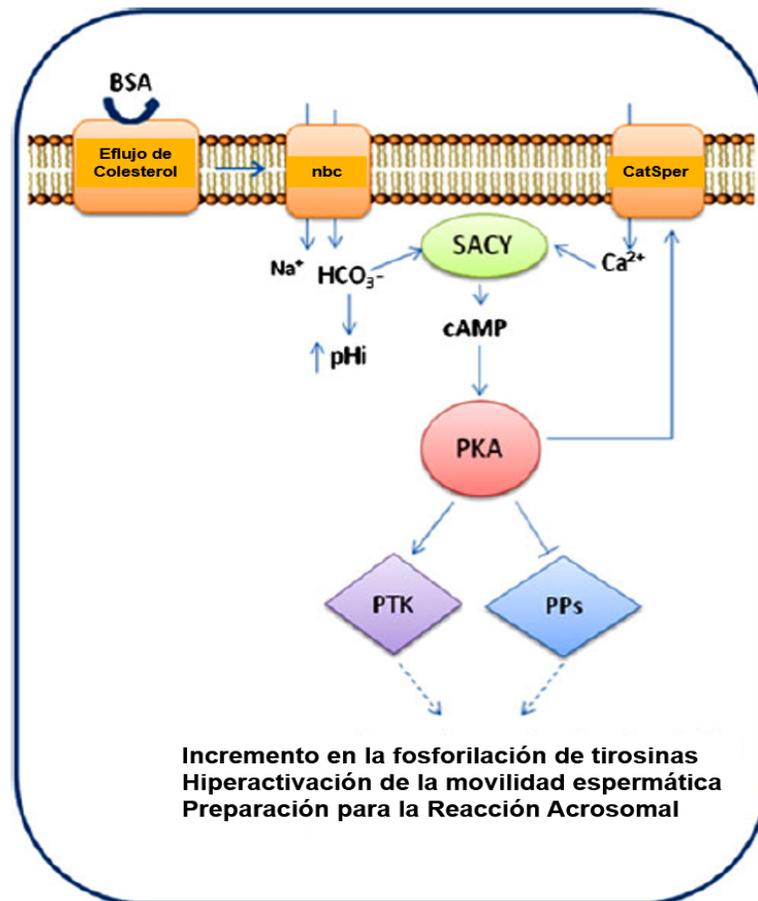


Figura 2. Eventos moleculares básicos asociados a la capacitación. Uno de los eventos principales es la salida de colesterol de la membrana por su receptor molecular, por ejemplo la albumina, que activa al cotransportador de $\text{Na}_+/\text{HCO}_3^-$ (nbc), que de forma simultánea, incrementa el pH intracelular y activa a adenil ciclasa soluble (SACY). La entrada de Ca^{2+} a través de CatSper también activa a SACY, este a su vez cataliza la producción cAMP, la cual activa a la proteína cinasa A (PKA). Entre las funciones de PKA es activar y mantener el influjo de Ca^{2+} a través de la activación de CatSper, activar a proteínas cinasas de tirosinas (PTK's) e inhibir la actividad de fosfatasa de proteínas (PP's). Modificado de (Signorelli *et al.*, 2012).

1.5.2 Exocitosis acrosomal o Reacción acrosomal

Una vez que el espermatozoide se capacita e interactúa con la ZP del ovocito, se desencadena una nueva serie de cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que provocan la fusión de la membrana plasmática (PM, siglas en inglés) con la

membrana acrosomal externa (OAM, siglas en inglés) que permite la liberación del contenido acrosomal. Este evento se conoce como “exocitosis acrosomal” o “reacción acrosomal” (RA) (Yanagimachi, 1994). Se considera que el término más adecuado es *exocitosis acrosomal* debido a que representa varios estados intermediarios que inician en la capacitación y que dan como resultado la liberación del contenido acrosomal. En cambio, el término *reacción acrosomal* representa uno de los dos estados binarios: acrosoma *reaccionado* o *no reaccionado* (Buffone *et al.*, 2014, 2012).

La exocitosis acrosomal difiere del mecanismo de exocitosis de otras células debido a: 1) cada espermatozoide tiene una sola vesícula secretora (acrosoma), 2) se requiere de múltiples sitios de fusión entre la PM y la OAM, 3) la pérdida de membrana del espermatozoide ocurre cuando se forman vesículas híbridas entre la PM y la OAM y, 4) no existe reciclamiento de membranas, por lo que es un proceso irreversible (Mayorga *et al.*, 2007).

En ratones y otros mamíferos, la exocitosis acrosomal inicia con la estimulación del espermatozoide por proteínas de la ZP, fluido folicular o progesterona secretado por el complejo cumulus-ovocito (Garner y Hafez, 1993). Durante la capacitación, la PM del espermatozoide se remodela y forma complejos funcionales en la región apical de la PM que participan en el reconocimiento y adhesión con las glicoproteínas de la ZP del ovocito, en específico con ZP3, y que dan inicio a la exocitosis acrosomal (Gestel *et al.*, 2007).

La unión del espermatozoide con la ZP3 activa a canales de Ca^{2+} que inducen el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espacio ubicado entre la PM y la OAM del espermatozoide y, la activación de otros segundos mensajeros como cAMP e Inositol trifosfato (IP_3). El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está regulado por una variedad de canales que incluyen canales intercambiadores, canales regulados por voltaje y canales regulados por IP_3 (Tulsiani *et al.*, 1997). Al mismo tiempo, la unión de IP_3 a su

receptor (IP_3R) en los almacenes de Ca^{2+} en el acrosoma, induce la salida de Ca^{2+} y favorece el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Breitbart, 2002).

Parecido a la capacitación, en la exocitosis acrosomal el incremento de Ca^{2+} induce el incremento del pH intracelular y se activa la cascada de AC/cAMP/PKA (Abou-haila y Tulsiani, 2009). La progesterona es una hormona esteroide presente en el fluido folicular que junto con otras hormonas a través de la unión con sus receptores en la PM del espermatozoides son capaces de inducir la exocitosis acrosomal (Osman *et al.*, 1989). Además, la activación de AC puede regularse por Ca^{2+} y por la unión de progesterona a receptores anclados a proteína G, (Wang *et al.*, 2014) y encender el mecanismo de proteínas cinasas dependientes de fosfolípidos (por ejemplo, fosfolipasa C (PLC)) (Breitbart *et al.*, 1992).

La activación de PLC cataliza la formación de diacilglicerol (DAG) e IP_3 . A su vez DAG activa a la PKC que junto con otra enzima activada por Ca^{2+} , fosfolipasa A_2 (PLA_2) participan en la fusión de membranas en la exocitosis acrosomal (Chen *et al.*, 2005).

Contrario a la capacitación en donde se requiere de la polimerización de actina F para adquirir un movimiento hiperactivado, en la exocitosis acrosomal se requiere de la despolimerización de actina F para que sea liberado el contenido acrosomal. Ocurre a través de la activación de PLC debido al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que induce la hidrólisis de PIP_2 lo cual resulta en la liberación y activación de gelsolina que al desfosforilarse por acción de las PP's permiten la despolimerización de actina F para formar actina G (Finkelstein *et al.*, 2010). La hidrólisis de actina F rompe la barrera física que existe entre la PM y la OAM, permitiendo de este modo, el acercamiento de ambas membranas (Abou-haila y Tulsiani, 2009).

Paralelo a la formación de actina G, la activación de PLA_2 por acción del Ca^{2+} , induce la producción de lisofosfolípidos por hidrólisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas, que promueven la fusión de la PM y la OAM en múltiples sitios y, la formación de vesículas híbridas entre ambas membranas (Spungin *et al.*, 1995).

Finalmente, la formación de vesículas en la región apical de la cabeza del espermatozoide, permiten la liberación del contenido acrosomal en la región de unión entre el espermatozoide y el complejo cumulus-ovocito. En la (Figura 3) se muestra un modelo que ilustra la posible cascada de señalización que conducen a la exocitosis acrosomal, propuesta por Breitbart, 2002.

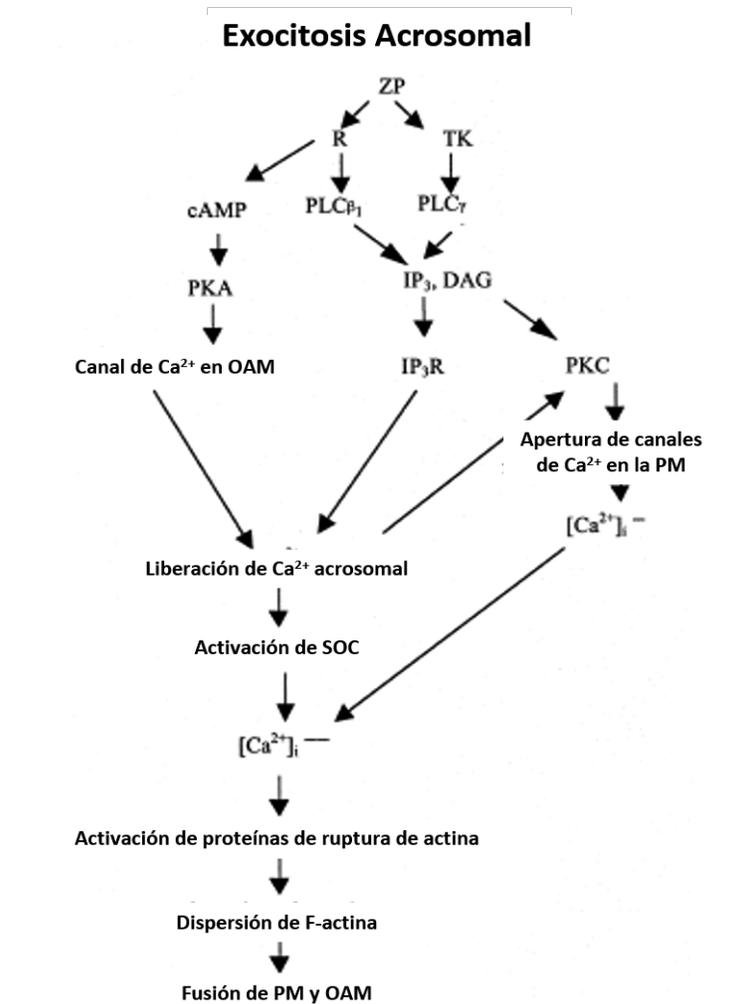


Figura 3. Posible cascada de señalización de la exocitosis acrosomal. La unión con la zona pelúcida (ZP) activa al menos a dos receptores: uno, al receptor acoplado a proteína G (R) que activa a PLCβ1 y puede regular la actividad de adenil ciclasa (AC), producir adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y activar a proteína cinasa A (PKA) y dos, al receptor de cinasa de tirosinas (TK) acoplada a PLCλ. La activación de ambas fosfolipasas catalizan la producción de inositol trifosfato (IP₃) y de diacilglicerol (DAG). PKA e IP₃ abren los canales de Ca²⁺ en la

membrana acrosomal externa (OAM) y PKC activa los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (PM), que conduce al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la activación del mecanismo de salida de Ca^{2+} de los almacenes acrosomales (SOC). El incremento sostenido de Ca^{2+} activa a una proteína de ruptura de actina F (gelsolina) que rompe la barrera entre la PM y OAM. Las dos membranas son capaces de fusionarse y liberar el contenido acrosomal. Modificado de (Breitbart, 2002).

1.5.3 Canales de Ca^{2+} en el espermatozoide

En la capacitación y exocitosis acrosomal, el incremento de Ca^{2+}_i se obtiene, en principio, del espacio extracelular en la región ístmica del tracto reproductor femenino, que es seguido por el incremento de Ca^{2+}_i que se libera de los almacenes del espermatozoide. La obtención del Ca^{2+} extracelular ocurre a través de una variedad de canales iónicos permeables a Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2006). Son canales tan diversos como los canales regulados por voltaje, el receptor potencial transitorio y los canales regulados por nucleótidos cíclicos (Rahman *et al.*, 2014). Existen además, la familia de canales específicos de espermatozoides, CatSper, los cuales son determinantes en la fertilidad masculina (Ren *et al.*, 2001). En este apartado se hace una breve descripción de los canales iónicos que regulan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Los canales de Ca^{2+} más recientes son los de la familia CatSper (Ren *et al.*, 2001). Se trata de canales específicos del espermatozoide que se limitan a la pieza principal del flagelo. Estudios en ratones (Ren *et al.*, 2001) y humanos (Cheon *et al.*, 2004) muestran que son dependientes de voltaje (bajo), sensibles a pH y de gran importancia en la capacidad fertilizante del espermatozoide (Singh y Rajender, 2015). Los canales CatSper de ratón y humano están conformados de al menos 7 subunidades que forman un canal iónico heteromérico permeable a Ca^{2+} : 4 subunidades CatSper α que forman un poro y, 3 subunidades accesorias β , γ y δ (Miller *et al.*, 2015). Se ha observado que el influjo sostenido de Ca^{2+} extracelular a través de los canales CatSper participa en la adquisición del movimiento

hiperactivado, liberación de la mucosa ístmica femenina, penetración del complejo cumulus-ovocito y finalmente la fertilización (Ho y Suarez, 2001).

Varios autores indican que la eliminación de cualquiera de las subunidades del canal CatSper provoca espermatozoides infértiles debido a fallas en el movimiento del flagelo (Rahman *et al.*, 2014). CatSper es regulado por moléculas liberadas por el complejo cumulus-ovocito, por fluido folicular, progesterona y prostaglandinas. Estas moléculas favorecen el incremento de Ca^{2+} a través de CatSper y activan la vía de señalización ACs/AMPC/PKA en la hiperactivación, capacitación y RA del espermatozoide (Brenker *et al.*, 2012).

Los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje (Ca_v) son los responsables del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ a través de cambios en el potencial de membrana (E_m). Estos canales se clasifican en dos grupos: canales activados por voltaje alto (HVA, Ca_v1 y Ca_v2), los cuales requieren de despolarizaciones fuertes de membrana y, canales activados por voltaje bajo (LVA, Ca_v3), estos canales se abren con despolarizaciones débiles (Darszon y Hernández-Cruz, 2014).

Varias proteínas cinasas como PKA, PKC y proteínas cinasas dependientes de calmodulina (CamMKII) activan a los canales Ca_v (Darszon *et al.*, 2011). Existen tres subfamilias de canales Ca_v : Ca_v1 con cuatro miembros ($Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$) todas conductoras de corrientes tipo-L, Ca_v2 con tres miembros ($Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$) que conducen corrientes tipo P/Q y Ca_v3 con tres miembros ($Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$) que conducen corrientes tipo-P. Las principales Ca_v que participan en la fisiología de células espermatozoides son las Ca_v3 (Darszon *et al.*, 2011).

Se ha reportado que la albumina sérica de bovino (BSA) activa a los canales Ca_v3 y contribuye al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la capacitación en espermatozoides de ratón (Espinosa *et al.*, 2000). A pesar de que se ha reportado la presencia de transcritos y proteínas de Ca_v en espermatozoide humano (Jagannathan *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003; Treviño *et al.*, 2004) su función aun no es completamente comprendida.

Otro canal de Ca^{2+} es el receptor potencial transitorio (TRP) que pertenece a una familia de canales catiónicos no selectivos multimodales presentes en las membranas plasmáticas de células sensoriales que detectan cambios químicos, fuerza mecánica y cambios en la temperatura, visión, gusto, olfato, tacto y sonidos (Nilius y Flockerzi, 2014). Una subfamilia de los TRP son los receptores potenciales transitorios canónicos (TRCP) que permiten la entrada de iones de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ . Se activan por eliminación de Ca^{2+} , pH, proteínas redox, PIP_2 , DAG y otros lípidos (Kiselyov y Patterson, 2009).

Existen siete miembros de la subfamilia TRCP, de las cuales TRCP1 ha sido detectada en el flagelo y en la cabeza del espermatozoide. Aunque no es claro el mecanismo de señalización, es probable que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de los canales TRCP1 participe en la modulación de la movilidad y la RA de espermatozoides (Darszon *et al.*, 2012).

Asimismo, los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNG, siglas en inglés) son canales iónicos que permiten el influjo de Ca^{2+} al citoplasma durante la capacitación espermática a través de su activación por nucleótidos cíclicos como AMPc y guanosín monofosfato cíclico (cGMP) (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado que la activación de los canales CNG regulan el influjo de Ca^{2+} en estadios tempranos de la capacitación de espermatozoides de ratón (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2014). Los canales CNG son más sensibles a GMPc que a AMPc y su actividad es regulada negativamente por el propio influjo de Ca^{2+} a través del canal CNG (Darszon *et al.*, 2005).

Adicional a los canales de Ca^{2+} se requieren de muchos otros componentes que son importantes para regulación del influjo de Ca^{2+} , tal como son los canales de protones regulados por voltaje (Hv1), que son los principales activadores de los canales CatSper (Lishko *et al.*, 2011), bombas Ca^{2+} -ATPasa (Wennemuth *et al.*, 2003), canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN) (Wiesner *et al.*, 1998), canales de potasio dependientes de pH, Slo3 (Brenker

et al., 2014) y receptores acoplados a proteína G (p.e receptores de progesterona) (Figura 4).

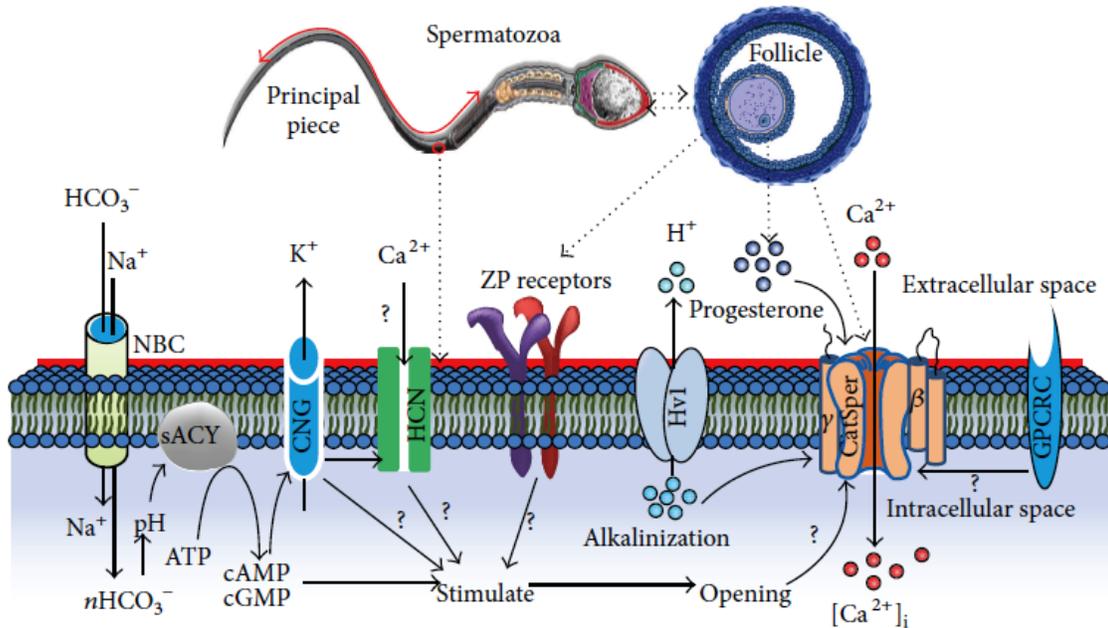


Figura 4. Posible ruta de transducción de señales del influjo de Ca²⁺ en espermatozoide de mamífero. Los canales de Ca²⁺ se localizan principalmente en la pieza principal del flagelo. El influjo de Ca²⁺ se regula principalmente por los canales CatSper, sin embargo, la interacción entre otros canales son responsables de la apertura de CatSper. Las diferentes moléculas representadas en el diagrama incluyen al cotransportador de Na⁺/HCO₃⁻ (NBC), adenil ciclasa soluble (sACY), adenosín trifosfato (ATP), adenosín monofosfato cíclico (cAMP), guanosín monofosfato cíclico (cGMP), canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (CNG), canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos activado por hiperpolarización (HCN), zona pelúcida (ZP), canal de protones regulado por voltaje (Hv1), receptor de glutamato de la familia clase C (GPCRC) y mecanismo desconocidos (?) (Rahman *et al.*, 2014).

1.5.4 Almacenes de Ca²⁺ intracelulares en el espermatozoide

En células somáticas, la señalización del Ca²⁺ regula una variedad de procesos fisiológicos. El incremento en la [Ca²⁺]_i se logra, principalmente, a través de la entrada de Ca²⁺ del medio extracelular y por la liberación de Ca²⁺ de los almacenes

intracelulares que se encuentran en el retículo endoplasmático, las mitocondrias, la envoltura nuclear, aparato de Golgi y lisosomas (Michelangeli *et al.*, 2005). Se considera a un organelo como un almacén de Ca^{2+} por su capacidad de introducir Ca^{2+} , principalmente por bombas ATPasa como la ATPasa del sarcoma o del retículo endoplasmático (SERCA) y, por su capacidad de liberar Ca^{2+} por acción de segundos mensajeros como IP_3 , rianodina (Ry) y por la propia presencia de Ca^{2+} (Costello *et al.*, 2009).

Durante los procesos de la capacitación y exocitosis acrosomal, el espermatozoide requiere del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para cumplir con su función biológica (Baldi *et al.*, 1991; Ruknudin y Silver, 1990). El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se regula por la apertura de canales iónicos, como los canales CatSper y también por la liberación del Ca^{2+}_i de los almacenes intracelulares del espermatozoide (Correia *et al.*, 2015).

En el proceso de espermiogénesis, la espermátida pierde gran parte de su citoplasma y de sus organelos intracelulares (que incluyen al retículo endoplasmático) para convertirse en un espermatozoide maduro, de esta forma, el espermatozoide posee reservas de Ca^{2+} intracelulares distintas a las de las células somáticas. La presencia de receptores de IP_3 (IP_3R) y de rianodina (RyR) en el espermatozoide han mostrado la existencia de diferentes almacenes intracelulares de Ca^{2+} , de los cuales, los tres más importantes son la membrana acrosomal externa, el cuello espermático, la pieza media y las mitocondrias (Bedu-Addo *et al.*, 2008).

El principal almacén de Ca^{2+} en el espermatozoide es la membrana acrosomal externa. La liberación de Ca^{2+} de este almacén es suficiente para inducir la exocitosis acrosomal (Herrick *et al.*, 2005). La unión del espermatozoide con la ZP del ovocito activa a receptores unidos a proteína-G que provoca la activación de PLC y conduce a la formación de IP_3 (Florman *et al.*, 2008). La unión de IP_3 a su receptor, el cual es un canal iónico sensitivo a Ca^{2+} , en la OAM del acrosoma induce la movilización del Ca^{2+} almacenado (Costello *et al.*, 2009). El Ca^{2+}_i liberado se detecta por la

calmodulina (CaM), una proteína ubicua que regula varias proteínas espermáticas dependientes de Ca^{2+} /CaM como las cinasas (CaMK y las Src), las fosfodiesterasas (PDE) y las fosfatasas (como PP2B) (Darszon *et al.*, 2005).

El segundo almacén de Ca^{2+} se localiza entre el cuello y la pieza media del espermatozoide que también presenta receptores a IP_3 y a calreticulina, una proteína de unión y almacenaje de Ca^{2+} (Bedu-Addo *et al.*, 2008; Costello *et al.*, 2009). Se ha demostrado en espermatozoides de bovino y de hámster que el Ca^{2+} almacenado entre el cuello y la pieza media se moviliza a través de la activación de los receptores de IP_3 y Ry y participa en la iniciación y mantenimiento del movimiento hiperactivado del flagelo durante la capacitación (Ho y Suarez, 2001; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2014).

La matriz mitocondrial constituye el tercer sitio de almacén de Ca^{2+} (Bedu-Addo *et al.*, 2008). El transporte de Ca^{2+} es a través de canales uniport (MCU), que se ubican en la membrana interna de la mitocondria. La aceptación de Ca^{2+} es regulada por el potencial de membrana negativo de la matriz mitocondrial (Costello *et al.*, 2009). En espermatozoides humanos, las mitocondrias juegan un papel importante en la homeostasis del Ca^{2+} ya que su capacidad de almacenaje y de liberación de las mitocondrias les permiten modular las diferentes rutas de señalización dependientes de Ca^{2+} , como las vías de producción de ATP (Piomboni *et al.*, 2012).

Los espermatozoides de los mamíferos son dependientes de la generación de ATP para mantener la movilidad progresiva, la hiperactivación, así como la fosforilación de proteínas durante la capacitación (Suarez y Ho, 2003).

2 ANTECEDENTES

En los últimos años se ha incrementado la producción de químicos que incluyen insecticidas, herbicidas, y surfactantes. Esta producción ha ido en aumento y se ha asociado con daños en el ambiente, y daños en la salud de personas que se exponen directa o indirectamente a estos compuestos, lo que ha motivado la investigación de sus efectos en numerosos estudios. Reportes recientes asocian la presencia de estos xenobióticos señalando daños a nivel reproductivo que van desde el comportamiento hasta la esterilidad, tanto masculina como femenina. Además, en específico, se ha reportado un aumento de compuestos persistentes en el ambiente, los PFCs, los cuales son sustancias orgánicas bioacumulables que poseen características nocivas que provocan efectos adversos en la salud y/o al ambiente (Fei *et al.*, 2009).

Toft y colaboradores (Toft *et al.*, 2012), realizaron un estudio para tratar de asociar la exposición a PFCs y la calidad del semen de 588 hombres provenientes de Groelandia, Polonia y Ucrania. Al determinar la concentración de PFCs en muestras de semen mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem, detectaron concentraciones de PFOA, PFOS, PFHxS y de PFNA (ácido perfluorononanoico) en el 97% de las muestras. Los investigadores concluyeron que los efectos adversos de PFOS en los espermatozoides se deben a la interferencia con la actividad endócrina o con la función de la membrana plasmática mientras que los efectos de PFOA se relacionan con la movilidad, sin embargo, existe controversia.

Joensen y colaboradores (Joensen *et al.*, 2009) investigaron la posible asociación de PFCs con la función testicular. Analizaron la concentración de 10 diferentes PFCs en suero sanguíneo de 105 hombres daneses adultos (edad promedio, 19 años) y reportaron concentraciones considerables de PFOS (24.5 ng/mL), PFOA (4.9 ng/mL) y ácido sulfónico perfluorohexano (6.6 ng/mL) que se relacionaron con un decremento en la concentración de espermatozoides en el eyaculado. Aquellos

hombres con mayor concentración de PFCs en suero tenían en promedio 6.2 millones de espermatozoides en contraste con los 15.5 millones de espermatozoides en hombres con baja concentración de PFCs.

De igual forma Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 2011) demostraron que la presencia de PFOS y PFOA en neuronas del hipocampo provocan incremento en la concentración de Ca^{2+} a través de la activación de los IP_3R y RyR por cambios en el potencial de membrana. Observaron que ambos compuestos inducen el influjo de Ca^{2+} extracelular mediante la activación de canales de Ca^{2+} Tipo-L y por movilización del Ca^{2+} de los almacenes espermáticos. El incremento de Ca^{2+} no regulado provocó disfunción celular en las neuronas que se asocian a fallas en la sinapsis.

Desde hace más de 20 años se considera que la fisiología de los sistemas reproductivo y endócrino del porcino son similares a los del humano y por lo mismo se utiliza como modelo experimental (Petters, 1994). En la última década, en nuestro laboratorio se ha utilizado como modelo de estudio al cerdo para realizar estudios de toxicología reproductiva en gametos y desarrollo embrionario temprano, estos estudios versan sobre el efecto de diversos pesticidas en la función de los gametos masculino y femenino desde su génesis, maduración, fertilización y desarrollo embrionario temprano a nivel fisiológico, bioquímico y molecular (Betancourt *et al.*, 2006; Bonilla *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2010; Ducolomb *et al.*, 2009; Maravilla-Galván *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2007).

3 JUSTIFICACION

Como se mencionó, varios estudios describen que los PFCs entre ellos el PFOA actúan como disruptores endocrinos, y se les ha asociado con un detrimento en la función reproductiva a varios niveles incluyendo la calidad espermática. Hasta el momento no hay datos que involucren la participación de los PFCs en la fisiología del espermatozoide. Debido a que se ha reportado que el PFOA afecta la homeostasis de Ca^{2+} en células somáticas, en el presente proyecto se propuso evaluar si el PFOA altera la homeostasis de Ca^{2+} durante la capacitación y la RA de espermatozoides de cerdo *in vitro*. Ya que como se sabe, durante el proceso de capacitación y RA del espermatozoide, el incremento de Ca^{2+} es uno de los pasos fundamentales para que ambos procesos sucedan adecuadamente.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tiene el PFOA en el flujo de Ca^{2+} en la movilidad, capacitación y RA de los espermatozoides de cerdo?

5 OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Determinar el efecto del PFOA en el flujo del Ca^{2+} durante la capacitación y RA de los espermatozoides de cerdo *in vitro*.

5.2 Particulares

- Determinar la concentración letal 50 (CL_{50}) y la concentración de inhibición de la capacitación 50 (CIC_{50}) de PFOA.

- Evaluar el efecto de las CL_{50} , $CL_{50/2}$, y $CL_{50/5}$ de PFOA en la movilidad de los espermatozoides expuestos durante la capacitación.
- Determinar si el PFOA afecta el flujo de Ca^{2+} en la capacitación y RA de espermatozoides *in vitro*.

6 HIPÓTESIS

Se ha reportado que el PFOA interfiere en la regulación del flujo de Ca^{2+} en células somáticas y que durante la capacitación de espermatozoides suceden cambios en el flujo de Ca^{2+} . Por lo tanto la adición de este compuesto perfluorado a espermatozoides de cerdo en medio capacitante modificará el flujo de Ca^{2+} durante la capacitación y RA, repercutiendo en su capacidad fecundante.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención del semen

Las muestras de semen se obtuvieron de cerdos sanos normozoospermicos de acuerdo con criterios establecidos (Garner and Hafez, 1993). Los eyaculados se obtuvieron por el método de "la mano enguantada". Se filtraron a través de una gasa para eliminar la fracción gelatinosa y se transportaron al laboratorio.

7.2 Evaluación espermática

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

Movilidad. Se determinó por observación directa al microscopio óptico a 100 X (Carl Zeiss Microscopy, LLC, United States) y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles. Sólo se utilizaron muestras que presentaron más de un 80 % de movilidad.

Viabilidad y anomalías morfológicas. Se determinaron por medio de la técnica de eosina-nigrosina (E-N) de acuerdo con los criterios previamente descritos (Flowers, 1997). Se realizó una dilución con la muestra y el colorante en una proporción de 1:1, se realizó un frotis y se dejó secar a temperatura ambiente. Los espermatozoides se observaron al microscopio óptico. Se contaron 200 células y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Se consideraron como espermatozoides vivos aquellos que no presentaron tinción y como espermatozoides muertos los teñidos completamente en color rosado. Con los mismos frotis se determinó el porcentaje total de espermatozoides con anomalías morfológicas, evaluando 200 células al microscopio óptico.

7.3 Preparación de la muestra

El semen se lavó dos veces con solución salina de fosfatos (PBS) a pH de 7.4, mediante dos ciclos de centrifugación sucesivos a 600 g por 5 minutos. En el último lavado, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de PBS (Jiménez et al., 2003).

a) Capacitación. Alícuotas de espermatozoides lavados a una concentración de 5×10^6 cel/mL se depositaron en cajas de 4 pozos (Nunc Denmark) con medio TALP-HEPES suplementado con BSA (6 mg/mL) y Piruvato de Sodio 1 mM (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) a pH 7.4. Se incubaron (Incubadora Lab-Line Instruments, Inc.) durante 4 horas a 38 °C, en una atmósfera húmeda y con 5 % de CO₂ en condiciones control (sin PFOA) y concentraciones de PFOA previamente determinadas CL₅₀, CL_{50/2}, y CL_{50/5} (Fierro *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2003).

b) Reacción acrosomal. Pasado el tiempo de capacitación se indujo la RA mediante la adición de progesterona (Sigma Chemical, St Louis M., USA) a una concentración final de 10 µg/mL y se incubaron durante 20 minutos en las mismas condiciones de capacitación (Berger, 1990).

c) Determinación de la CL₅₀. El PFOA es un compuesto soluble en agua y aceite, por este motivo, se utilizó medio de capacitación TALP-HEPES sin suplementar para disolver el tóxico y se preparó el mismo día de uso. Los espermatozoides se capacitaron en intervalos de concentraciones de PFOA desde 190 hasta 950 µM.

Para evaluar los espermatozoides del grupo control se analizaron tres condiciones: espermatozoides frescos o sin capacitar, capacitados y espermatozoides reaccionados. En los espermatozoides expuestos a la CL₅₀, CL_{50/2}, y CL_{50/5} de PFOA se evaluó la capacitación, movilidad y la RA.

7.4 Evaluación de la muestra mediante CTC

La capacitación y la RA se evaluaron por medio de la tinción de clorotetraciclina (CTC) (Caswell y Hutchison, 1971). La CTC se preparó a una concentración de 750 μM en Tris 20 mM; NaCl 130 mM; L-cisteína 5 mM, a pH 7.8. En un portaobjetos se mezclaron 5 μL de la suspensión de espermatozoides previamente fijados en glutaraldehído 0.2 % en Tris 0.5 M a pH 7.4 con 5 μL de CTC y se observaron las laminillas en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss Microscopy, LLC, United States) con el rango de longitud de onda de 494-520 nm.

Tomando en cuenta como control de la capacitación los espermatozoides que no fueron expuestos al tóxico, para cada condición se observaron 200 espermatozoides y se determinó su estado fisiológico de acuerdo a distribución del CTC en su membrana plasmática según los patrones de tinción reportados previamente (Caswell y Hutchison, 1971; Kwon et al., 2014):

No capacitados. Fluorescencia uniforme en la cabeza y acrosoma intacto, características de espermatozoides sin capacitar.

Capacitados. La fluorescencia se concentra en la región acrosomal y una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal. Características de que el espermatozoide está capacitado con acrosoma intacto.

Reaccionados. No presenta fluorescencia en la cabeza, excepto una banda delgada fluorescente en la región ecuatorial.

Evaluación del Ca^{2+} en el espermatozoide con microscopia de epifluorescencia

Para evaluar el flujo de Ca^{2+} se utilizó el indicador de Ca^{2+} intracelular Fluo-3 AM (Molecular Probes, Eugene, OR). Los espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados, en condiciones control y en presencia del tóxico, se lavaron con solución fisiológica PBS y se resuspendieron a una concentración de (5×10^6 cel/mL) para adicionar 2 μL de Fluo-3 AM (solución stock 1 mM de acuerdo al protocolo de

(Mata-Martínez et al., 2013). Posteriormente se incubaron a 38°C por 30 min en completa oscuridad y transcurrido ese tiempo se lavaron un par de veces y se analizaron en el microscopio de epifluorescencia.

La distribución de Ca²⁺ se evaluó en cada célula con microscopia de epifluorescencia a una longitud de onda de 506-526 nm y se revisaron 200 espermatozoides para cada estado fisiológico y concentración probada.

Evaluación del Ca²⁺i en el espermatozoide con citometría de flujo

Los espermatozoides sin capacitar, capacitados y reaccionados (en condiciones control y con tóxico) se lavaron con PBS previo a su evaluación del flujo de Ca²⁺ con citometría de flujo. A cada suspensión de espermatozoides (5X10⁶ cel/mL) se les adicionaron 2 µL de Fluo-3 AM (solución stock 1 mM) y 2 µL de Yoduro de Propidio (PI, siglás en inglés) (solución stock 2.4 mM) para determinar además el porcentaje de viabilidad (Mata-Martínez et al., 2013).

En cada condición (frescos, capacitados y reaccionados con y sin tóxico) se evaluaron 20,000 eventos en un citómetro de flujo BD FACSCalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) y se analizaron con Flowing Software Version 2.5.

7.5 Análisis Estadístico

Se utilizó el análisis de regresión binomial Probit para calcular la CL50 y CIC50. Se realizaron cinco experimentos por duplicado para cada condición experimental: control, CL50, CL50/2 y CL50/5. Todos los resultados se reportaron como la media ± el error estándar (E.E). Se realizó una prueba de ANOVA de una vía y una prueba post-hoc Tukey-Kramer y Bonferroni para comparación múltiple entre grupos. Las diferencias con valor p<0.05 se consideraron significativas.

8 RESULTADOS

8.1 Determinación de la CL50

La CL₅₀ se determinó evaluando la viabilidad espermática mediante la tinción de eosina-nigrosina en los espermatozoides control (espermatozoides capacitados y reaccionados sin PFOA) y en espermatozoides capacitados y reaccionados con las 3 concentraciones experimentales 100, 300 y 600 µM de PFOA. Los resultados obtenidos indican que la viabilidad espermática disminuye después de la capacitación en 77%, 73% y 62% respectivamente conforme aumenta la concentración del PFOA con diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control vs. 600 µM de PFOA (Cuadro 1, Figura 5). En la RA también se observó disminución de la viabilidad (76%, 66% y 60%) sin diferencias significativas.

Cuadro 1. Efecto del PFOA en la viabilidad espermática en la capacitación y RA <i>in vitro</i>		
	Capacitación (%)	RA (%)
Control	82 ± 1.75	78 ± 4.26
100 µM	77 ± 4.12	76 ± 5.09
300 µM	73 ± 3.08	66 ± 7.80
600 µM	*62 ± 5.00	60 ± 9.46

RA: Reacción acrosomal

Los datos se presentan como la media ± el error estándar (X ± E.E) (n=5).

* Diferencias significativas vs control (p<0.05)

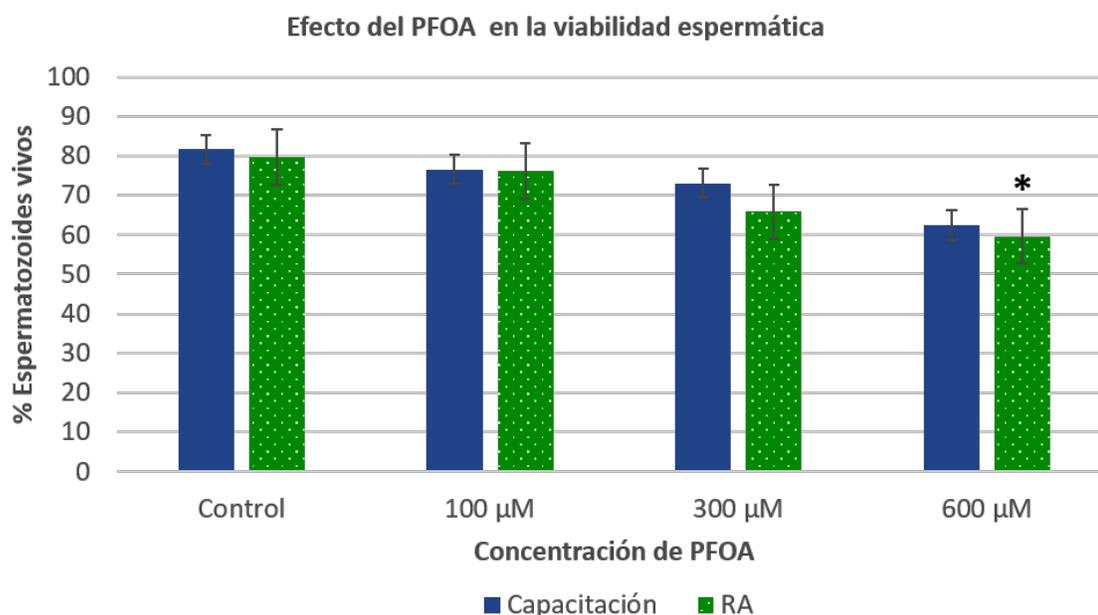


Figura 5. Efecto del PFOA en la viabilidad espermática en la capacitación y la RA *in vitro* con 100, 300 y 600 μM de PFOA. La viabilidad en la capacitación y RA se evaluaron con la tinción de Eosina-nigrosina, se analizaron 200 espermatozoides. Los datos se presentan como medias ± el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control $p < 0.05$.

Con los resultados de viabilidad se realizó el análisis de regresión binomial Probit y se determinó que la CL_{50} teórica es de 954 μM con un límite inferior de 681 μM y un límite superior de 1937 μM. Para evaluar el efecto del PFOA en la capacitación y RA se utilizaron las concentraciones 190, 478 y 950 μM de PFOA que representan la $CL_{50/5}$, $CL_{50/2}$ y CL_{50} teóricas, respectivamente. Asimismo se evaluó su efecto en la viabilidad con estas concentraciones.

Al evaluar la viabilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos en la capacitación fue del 85% y en la RA de 88%; después de la incubación con las concentraciones teóricas obtenidas de PFOA (190, 478 y 950 μM) la viabilidad se mantiene en un 87, 83 y 80% en la capacitación sin diferencias significativas mientras que en la RA se obtuvo un 84, 81 y 75% con diferencias estadísticamente significativas entre el control y 950 μM de PFOA (Cuadro 2). Los resultados demuestran que la presencia

de PFOA no tiene efecto estadísticamente significativo en la viabilidad durante el proceso de capacitación incluso en altas concentraciones, a diferencia de la RA donde se observaron diferencias significativas con la mayor concentración de PFOA (Figura 6).

Cuadro 2. Efecto del PFOA en la viabilidad espermática en la capacitación y RA *in vitro*

	Capacitación (%)	RA (%)
Control	85 ± 2.0	88 ± 2.5
190 µM	87 ± 2.5	84 ± 2.2
478 µM	83 ± 2.9	81 ± 2.4
950 µM	80 ± 2.0	*75 ± 2.7

RA: Reacción acrosomal

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

*Diferencias significativas vs control ($p < 0.05$)

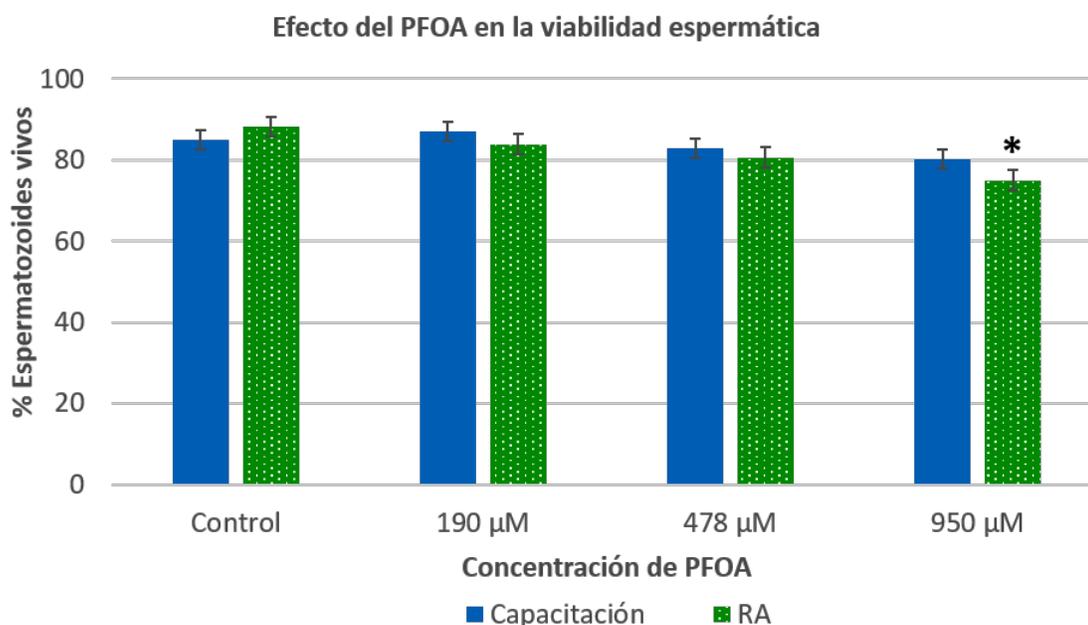


Figura 6. Efecto de PFOA a 190, 478 y 950 µM en la viabilidad espermática en la capacitación y la RA *in vitro*. La viabilidad en capacitación y RA se evaluó con la tinción de Eosina-nigrosina, se analizaron 200 espermatozoides. El PFOA a 950 µM de PFOA provoca disminución

significativa en la viabilidad espermática en la RA. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm E.E$) ($n=5$). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$).

8.2 Determinación de la CIC_{50}

Los patrones de tinción con clorotetraciclina (CTC) se estandarizaron y se evaluaron 200 espermatozoides en cada condición experimental de cinco cerdos. Se evaluaron muestras de espermatozoides sin capacitar, capacitados y reaccionados con las diferentes concentraciones de PFOA para determinar la CIC_{50} . Se observaron cinco patrones de tinción: 1) fluorescencia uniforme en la cabeza y flagelo, 2) ausencia de fluorescencia en la región postacrosomal y fluorescencia débil en la región acrosomal, 3) formación de un arco en la región ecuatorial con fluorescencia débil o ausente en la región postacrosomal, 4) fluorescencia únicamente en la región ecuatorial y 5) fluorescencia en la región postacrosomal con débil o ausente fluorescencia en la región acrosomal (Figura 7). El patrón de tinción 1 corresponde a lo ya reportado en espermatozoides no capacitados, los patrones 2 y 3 a espermatozoides capacitados y los patrones 4 y 5 corresponden a reaccionados. Los patrones de tinción obtenidos con CTC coinciden con reportes previos (Caswell y Hutchison, 1971; Kwon et al., 2014).

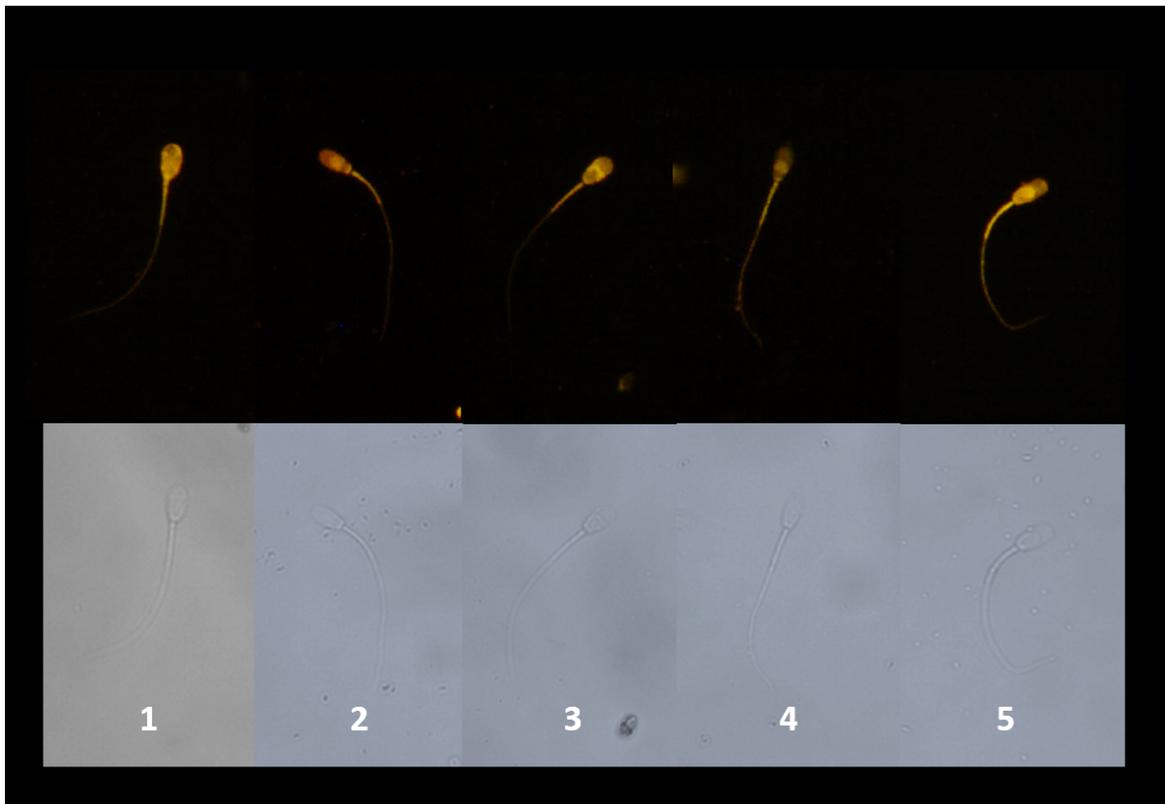


Figura 7. Patrones de fluorescencia. Fotografías con microscopia de fluorescencia, magnificación 400x. Patrones de tinción con clorotetraciclina (CTC). Patrón 1) espermatozoides no capacitados, patrón 2 y 3) espermatozoides capacitados y, patrón 4 y 5) espermatozoides reaccionados.

En los Cuadros 3 y 4 se muestran los porcentajes de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados observados antes de la capacitación, y en la capacitación en condiciones control y con las diferentes concentraciones del tóxico.

Al tiempo cero (espermatozoides sin capacitar) se observa en promedio un 91% de espermatozoides no capacitados, por lo que, se consideraron muestras aptas para la capacitación *in vitro*. Se evaluó el efecto del PFOA en la capacitación *in vitro*; se observó que en condiciones control, se capacita el 83% de los espermatozoides, la adición de 190, 478 y 950 μM de PFOA mantuvo la proporción de espermatozoides capacitados en 86%, 85% y 85%, sin diferencias estadísticamente significativas. Al

evaluar el porcentaje de espermatozoides reaccionados en la capacitación (reacción acrosomal espontánea) en condiciones control y se obtuvo un 9%; la incubación con 190, 478 y 950 μM de PFOA mantuvieron un 8%, 10% y 11%, respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de PFOA en la capacitación espermática *in vitro* evaluado con CTC.

	No capacitados (%)	Capacitados (%)	Reaccionados (Fisiológica) (%)
Sin capacitar	91 \pm 0.91	7 \pm 0.85	2 \pm 0.63
Control	9 \pm 1.57	83 \pm 1.68	9 \pm 1.13
190 μM	7 \pm 1.01	86 \pm 1.06	8 \pm 0.58
478 μM	5 \pm 0.80	85 \pm 1.15	10 \pm 1.00
950 μM	4 \pm 1.06	85 \pm 1.51	11 \pm 1.72

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar ($X \pm \text{E.E}$) (n=5).

Comparación múltiple no mostró diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$)

El efecto de PFOA en la RA inducida con progesterona, presentó un 14% de espermatozoides reaccionados y un 15% con las concentraciones de 190, 475 y 950 μM de PFOA. De la misma manera el porcentaje de espermatozoides capacitados presentes en las mismas muestras, presentó un 80% en el control, y se mantuvo en 81% incluso en la concentración más alta de PFOA (950 μM) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de PFOA en la RA *in vitro* evaluado con CTC.

	No capacitados (%)	Capcitados (%)	Reaccionados (Inducida) (%)
Sin capacitar	91 ± 0.91	7 ± 0.85	2 ± 0.63
Control	5 ± 0.77	80 ± 1.85	15 ± 2.03
190 µM	5 ± 0.48	80 ± 1.05	15 ± 0.68
478 µM	4 ± 1.20	80 ± 2.56	16 ± 2.99
950 µM	4 ± 0.45	77 ± 2.95	19 ± 3.67

RA: Reacción acrosomal

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

Comparación múltiple no mostró diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos con CTC para ambas condiciones fisiológicas, la capacitación y la RA inducida con progesterona, no mostraron cambios estadísticamente significativos entre el control y las diferentes concentraciones de PFOA.

8.3 Efecto del PFOA en el flujo de Ca^{2+} i evaluado con microscopia de epifluorescencia

Para estandarizar los patrones de tinción con el indicador de calcio intracelular Fluo-3 AM se evaluaron muestras control de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados con microscopia de fluorescencia (Figura 8). Se observaron 5 patrones de fluorescencia: 1) la fluorescencia es homogénea en la cabeza y en el flagelo del espermatozoide, 2) el espermatozoide presenta fluorescencia sobresaliente en la cabeza y la pieza media y, se forma un anillo oscuro en la región ecuatorial, 3) el espermatozoide presenta fluorescencia débil en la cabeza, mientras que en la pieza media es más sobresaliente, 4) la fluorescencia es intensa únicamente en la pieza media y 5) el espermatozoide presenta fluorescencia solo en la pieza media pero no es uniforme (irregular).

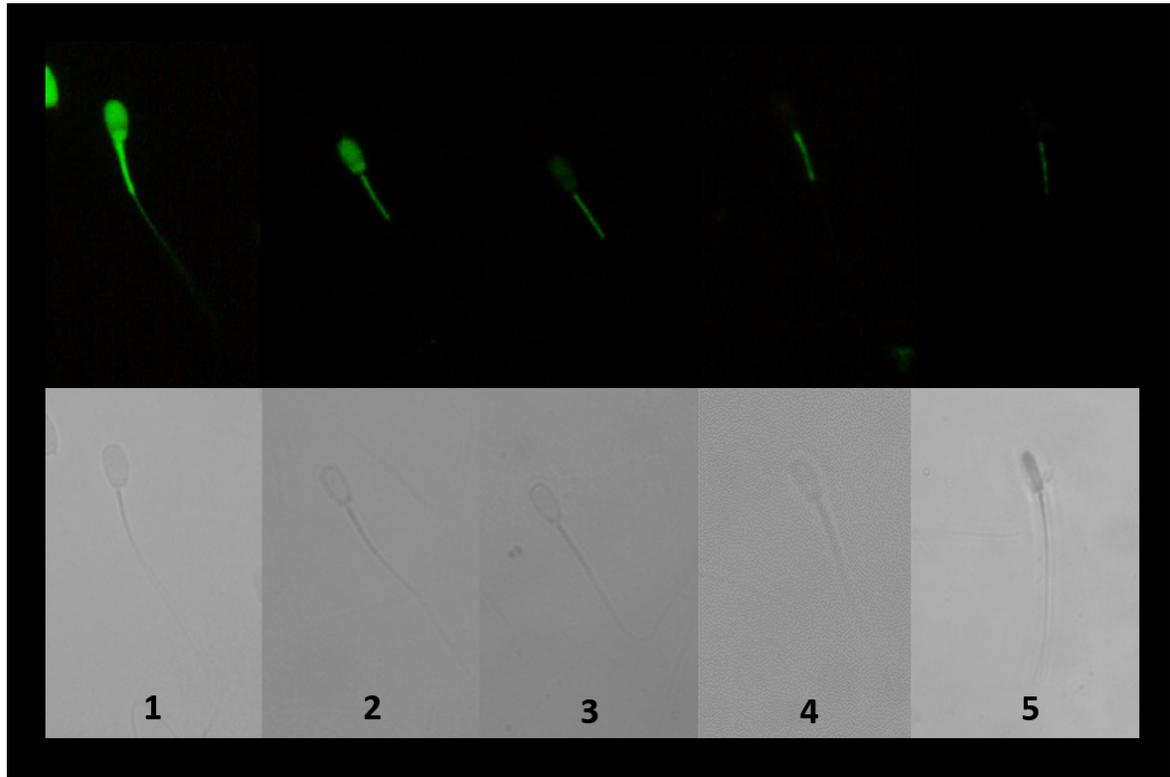


Figura 8. Patrones de tinción con el indicador de Ca^{2+} i Fluo -3 AM. Fotografías con microscopía de fluorescencia, magnificación 400x. Se consideraron los patrones 1, 2 y 3 como espermatozoides no capacitados; al patrón 4 como espermatozoides capacitados y al patrón 5 como espermatozoides reaccionados

Cuadro 5. Porcentaje de espermatozoides en cada patrón de tinción con Fluo-3 AM en condiciones control.					
Patrón de tinción	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)
Sin capacitar	7 ± 6.2	20 ± 9.2	58 ± 10.1	14 ± 7.2	0 ± 0.2
Capacitación	4 ± 1.3	8 ± 1.0	10 ± 1.9	75 ± 2.9	4 ± 1.3
RA	1 ± 1.1	5 ± 1.5	9 ± 1.8	70 ± 4.1	14 ± 2.7

RA: Reacción acrosomal

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

En ausencia del tóxico se determinó el porcentaje de espermatozoides de cada patrón de tinción observados con Fluo-3 AM en las condiciones sin capacitar, en la capacitación y la RA (Cuadro 5). Con base en los porcentajes de espermatozoides obtenidos en cada condición fisiológica, se consideraron a los patrones 1 (1%), 2 (20%) y 3 (58%) como espermatozoides no capacitados; al patrón 4 (75%) como espermatozoides capacitados y al patrón 5 (14%) como espermatozoides reaccionados.

Es importante mencionar que la determinación de los patrones de tinción con Fluo-3 AM indican la distribución del Ca^{2+}_i en el espermatozoide y no se puede considerar que un patrón u otro es más fluorescente (es decir, tiene más Ca^{2+}_i) porque el análisis con microscopia de epifluorescencia no proporciona información cuantitativa respecto al Ca^{2+}_i . Para obtener datos cuantitativos respecto al flujo de Ca^{2+} en cada tratamiento y condición fisiológica se realizó un análisis con citometría de flujo (ver más adelante).

Una vez establecidos los criterios de tinción con Fluo-3 AM, se evaluaron los porcentajes de espermatozoides observados después del proceso de capacitación y RA en presencia de las diferentes concentraciones de PFOA.

En ambos procesos, capacitación y RA, se observó disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón de tinción 4) (Cuadro 6, Figura 9). La proporción de espermatozoides en la capacitación fue del 75%; después de la incubación con las diferentes concentraciones de PFOA esta proporción de espermatozoides capacitados disminuyó a 68%, 58% y 54%, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas entre el control vs. 478 y 950 μ M de PFOA. En la RA la proporción de espermatozoides capacitados fue del 70%; después de la incubación con las diferentes concentraciones de PFOA la proporción de capacitados disminuyó a 72%, 62% y 47%, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas entre el control vs 950 μ M de PFOA.

Cuadro 6. Efecto de diferentes concentraciones de PFOA en el porcentaje de espermatozoides capacitados en la capacitación y RA *in vitro* evaluado con Fluo-3 AM.

	Capacitación (%)	RA (%)
Control	75 ± 2.99	70 ± 4.19
190 µM	68 ± 3.51	72 ± 2.82
478 µM	*58 ± 3.33	62 ± 4.02
950 µM	*54 ± 2.73	+ 47 ± 3.46

RA: Reacción acrosomal

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

*Diferencias significativas vs control ($p < 0.05$), + Diferencias significativas vs control ($p < 0.05$)

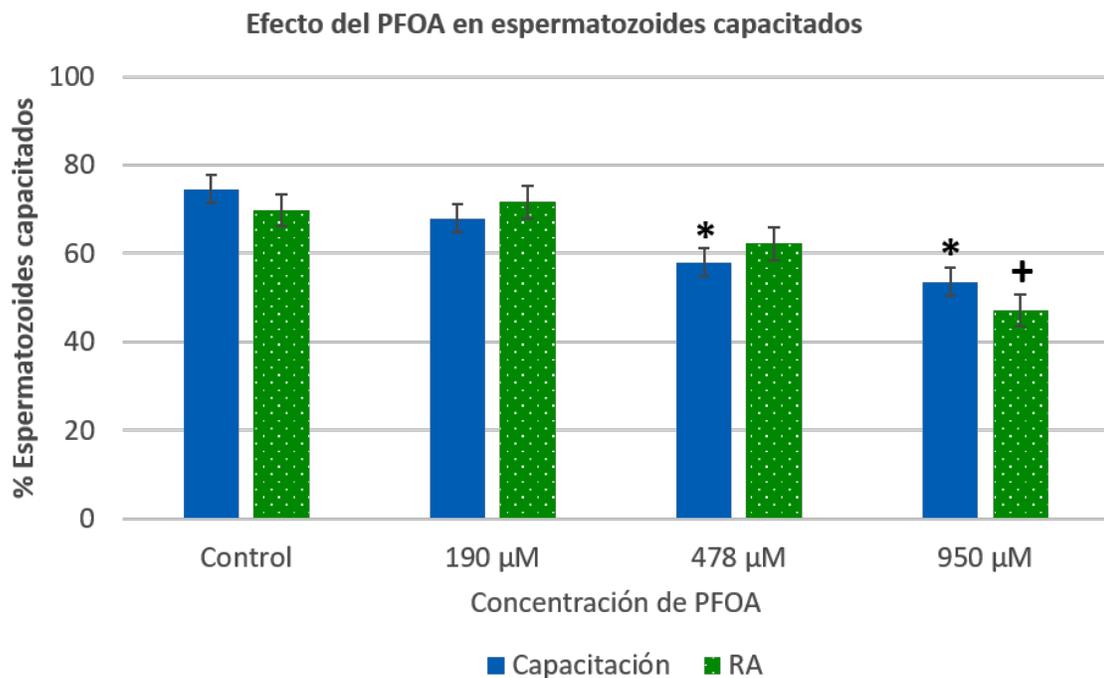


Figura 9. Efecto de 190, 478 y 950 µM de PFOA en el porcentaje de espermatozoides capacitados (de acuerdo con el patrón de tinción 4) en la capacitación y RA *in vitro*. PFOA provocó disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados en la capacitación y RA.

Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$), +Diferencias vs. control ($p<0.05$).

Se evaluaron los porcentajes de espermatozoides reaccionados (patrón de tinción 5) durante la capacitación y RA con las concentraciones de PFOA (Cuadro 7, Figura 10). Durante la capacitación, se observó un 4% de espermatozoides reaccionados espontáneamente en el control, este porcentaje incrementó a 10%, 17% y 34% con respecto a las tres concentraciones de PFOA. Al inducir la RA con progesterona, se observó el mismo comportamiento, se incrementó el número de espermatozoides reaccionados desde 14% en control hasta 16, 27 y 49% con 190, 478 y 950 μM de PFOA, respectivamente. En ambos procesos, capacitación y RA, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y las concentraciones de 478 y 950 μM de PFOA.

Cuadro 7. Efecto de diferentes concentraciones de PFOA en el porcentaje de espermatozoides reaccionados en la capacitación (reacción acrosomal espontánea) y RA (reacción acrosomal inducida) *in vitro* evaluado con Fluo-3 AM.

	Capacitación (%)	RA (%)
Control	4 \pm 1.21	14 \pm 2.73
190 μM	10 \pm 2.82	16 \pm 1.82
478 μM	*17 \pm 1.17	+27 \pm 2.37
950 μM	*34 \pm 2.94	+49 \pm 3.33

RA: Reacción acrosomal

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

*Diferencias significativas vs control ($p<0.05$), + Diferencias significativas vs control ($p<0.05$)

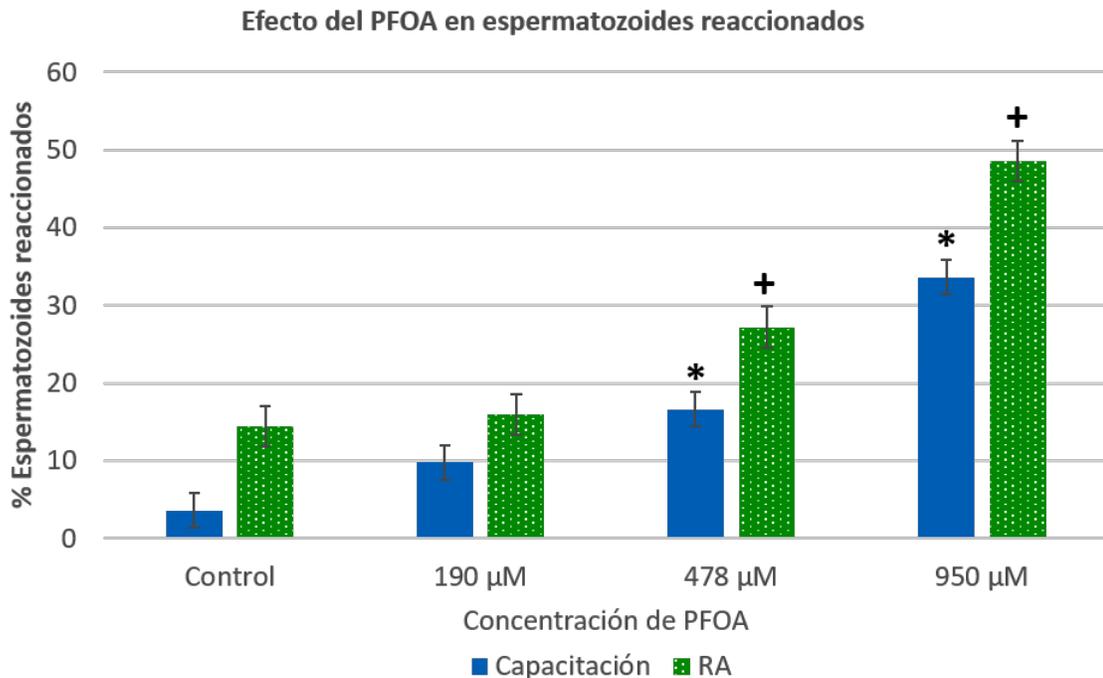


Figura 10. Efecto de PFOA en el porcentaje de espermatozoides reaccionados (de acuerdo al patrón de tinción 5) en la capacitación (RA espontánea) y la RA (RA inducida) *in vitro*. El PFOA provocó incremento de los espermatozoides reaccionados en ambos procesos. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control ($p < 0.05$), +Diferencias significativas vs. control ($p < 0.05$).

8.4 Efecto del PFOA sobre la movilidad de espermatozoides capacitados

Se evaluó la movilidad espermática en espermatozoides con las diferentes concentraciones de PFOA. La movilidad espermática se evaluó en un microscopio invertido a 400x. Se estimó un porcentaje de espermatozoides hiperactivados y de espermatozoides aglutinados según (Garner and Hafez, 1993) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de diferentes concentraciones de PFOA en la movilidad espermática en la capacitación *in vitro*.

	Móviles (%)	Aglutinados (%)	Tamaño del aglutinado
Control	88	83	med-gdes
190 μM	86	77	med-peq
478 μM	85	72	med-peq
950 μM	85	60	med-peq

Los datos se presentan como la media (n=5).

En la capacitación, el porcentaje de espermatozoides móviles fue del 88% y este varió muy poco al incubarse con 190 μ M, 478 μ M y 950 μ M de PFOA (86%, 85% y 85%, respectivamente). PFOA no provocó diferencias en el porcentaje de espermatozoides móviles; en este grupo se consideraron a los espermatozoides con movimiento hiperactivado, es decir, un movimiento asimétrico vigoroso con bateo amplio del flagelo y desplazamiento lateral de la cabeza (Armon and Eisenbach, 2011), el cual es un movimiento característico de la capacitación y es limitante en el proceso de fertilización.

Respecto a la aglutinación, se observó un 83% de espermatozoides aglutinados en el control y este disminuyó hasta 60% con la concentración de 950 μ M de PFOA, así como disminución en el tamaño de los aglutinados de grandes a pequeños.

8.5 Efecto del PFOA en el flujo de Ca^{2+} evaluado con citometría de flujo.

Se determinó el efecto del PFOA en el flujo de Ca^{2+} en espermatozoides sin capacitar, capacitados y reaccionados con el indicador de Ca^{2+} Fluo-3 AM con citometría de flujo. Se adquirieron 20,000 eventos y se analizaron en el programa Cell Quest. Se determinó el Índice de Fluorescencia (IF), el cual resulta del producto

del porcentaje de células positivas a un marcador específico y la fluorescencia media emitida por el indicador fluorescente. El IF es un valor que representa la fluorescencia emitida por una población de células determinadas, es decir, en espermatozoides marcados con Fluo-3 AM, el IF representa el Ca^{2+} i presente en espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados.

Se determinaron 3 regiones en los histogramas generados con el citómetro de flujo: M1, M2 y M3 que corresponden a poblaciones de espermatozoides con emisión de fluorescencia (flujo de Ca^{2+} i) diferente (Figura 11). La región M1 corresponde a *autofluorescencia* o *negativo* para el fluorocromo, su valor es despreciable y no es representativo en las gráficas; en espermatozoides sin capacitar se observa la formación de una sola población de espermatozoides con distribución de Ca^{2+} i homogénea y corresponde a la región M2; en espermatozoides capacitados y reaccionados se observa la formación de una nueva población de espermatozoides con distribución de Ca^{2+} i diferente a M2, la población M3.

Poblaciones de espermatozoides M1, M2 y M3 con Fluo-3 AM

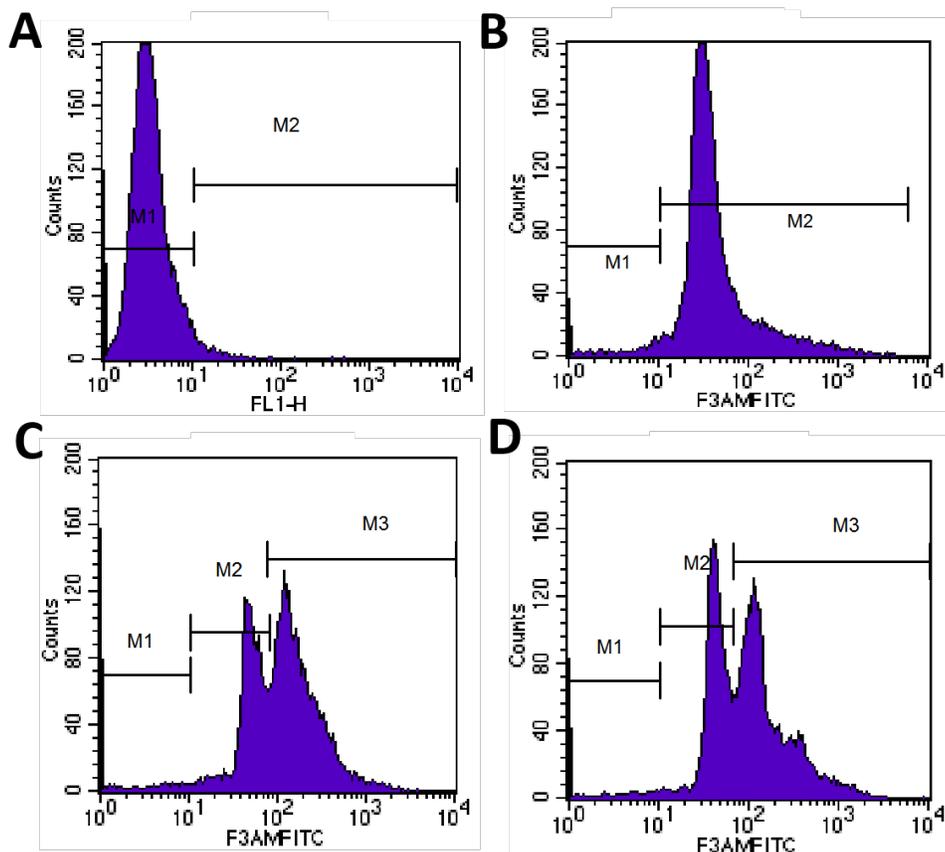


Figura 11. Poblaciones de espermatozoides determinadas con el indicador de Ca^{2+} i Fluo-3 AM analizados con citometría de flujo. A) Autofluorescencia o control negativo a Fluo-3 AM, B) control positivo a Fluo-3 AM en espermatozoides sin capacitar, C y D) control positivo a Fluo-3 AM en espermatozoides capacitados y reaccionados. M1, región de autofluorescencia o control negativo, M2 y M3, poblaciones de espermatozoides con diferente flujo de Ca^{2+} i.

Se determinó el flujo de Ca^{2+} i en espermatozoides control sin capacitar, capacitados y reaccionados (Cuadro 9, Figura 12). En espermatozoides sin capacitar, se observó la formación sólo de M2 con un IF de 11,022. En espermatozoides capacitados se observó la formación de M2 y M3 con un IF de 6,860 y 28,636, mientras que en la RA se observó un IF de 6,415 y 29,131 para M2 y M3, respectivamente.

Cuadro 9. IF de las poblaciones M1, M2 y M3 de espermatozoides en condiciones control.			
	M1 (IF)	M2 (IF)	M3 (IF)
Sin capacitar	95 ± 32	11,022 ± 2,598	0.00
Capacitación	90 ± 8	6,860 ± 442	28,636 ± 1,184
RA	162 ± 53	6,415 ± 53	29,131 ± 3,293

RA: Reacción acrosomal, IF: Índice de fluorescencia

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

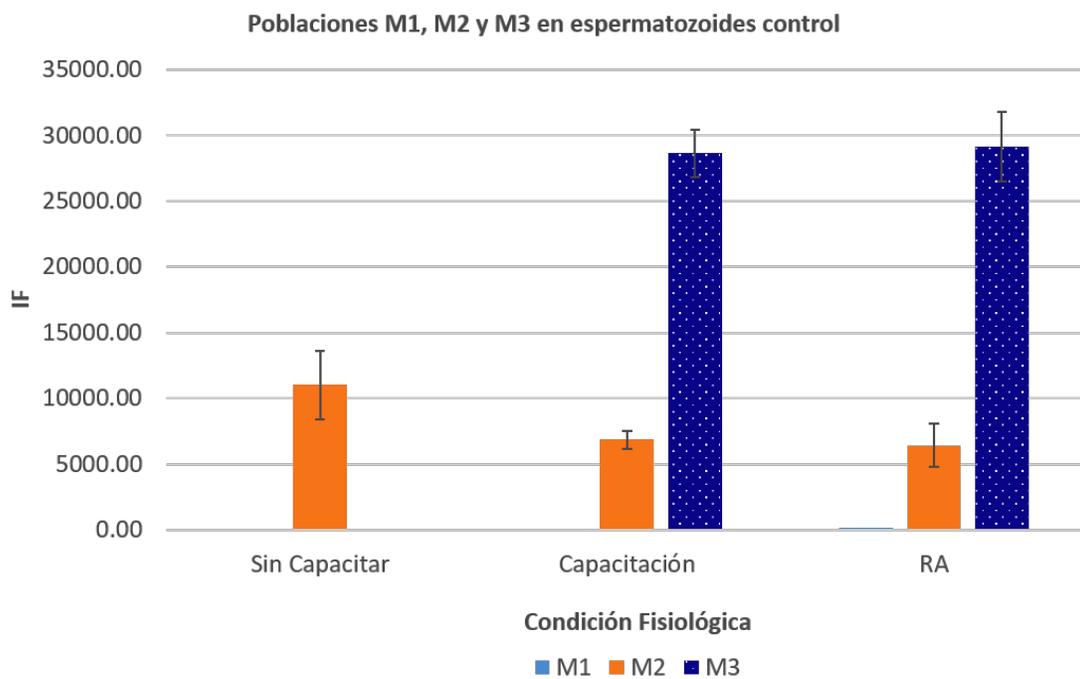


Figura 12. Índice de Fluorescencia (IF) en espermatozoides control sin capacitar, capacitados y reaccionados, teñidos con Fluo-3 AM. M1) Autofluorescencia, M2 y M3) poblaciones de espermatozoides con flujo de Ca^{2+} diferente. En espermatozoides sin capacitar sólo se forma M2, la cual es una población de espermatozoides con Ca^{2+} bajo, mientras que en capacitados y reaccionados se forman las poblaciones M2 y M3, donde M3 representa una población de espermatozoides con incremento de Ca^{2+} . Los datos se presentan como medias ± el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

Con base en los resultados obtenidos anteriormente con CTC, donde una muestra sin capacitar contiene un 91% de células no capacitadas y el análisis con citometría de flujo en una muestra sin capacitar donde solo presenta una población (M2) con un IF pequeño (poco Ca^{2+} i), se consideró a M2 como la población espermática no capacitada. En ambos eventos, la capacitación y RA, el espermatozoide requiere del incremento sostenido de Ca^{2+} i para cumplir con su función biológica. El análisis con citometría de flujo mostró que en espermatozoides capacitados y reaccionados se forma la población M3 con un IF alto, que representa incremento de Ca^{2+} i, respecto a la población M2 de los espermatozoides sin capacitar (ver Cuadro 8), se consideró a M3 como la población espermática de espermatozoides capacitados y reaccionados.

En la capacitación, el IF en M2 fue de 6,860 y se mantuvo en 5,978, 6,761 y 7,161 con 190, 478 y 959 μ M de PFOA, respectivamente sin diferencias significativas. El IF en M3 fue de 28,636; la incubación con las tres concentraciones de PFOA mostró un IF de 27,926, 28,039 y 20,116 respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y 950 μ M de PFOA (Cuadro10, Figura 13).

Cuadro 10. Efecto de diferentes concentraciones de PFOA en el Ca^{2+} i de espermatozoides capacitados <i>in vitro</i> marcados con Fluo-3 AM, evaluados con citometría de flujo.		
	M2 (IF)	M3 (IF)
Control	6,860 \pm 442	28,636 \pm 1,184
190 μM	5,978 \pm 986	27,926 \pm 1,695
478 μM	6,761 \pm 558	28,039 \pm 2,116
950 μM	7,161 \pm 568	*20,116 \pm 3,022

RA: Reacción acrosomal, IF: Índice de fluorescencia

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

*Diferencias significativas vs control ($p < 0.05$)

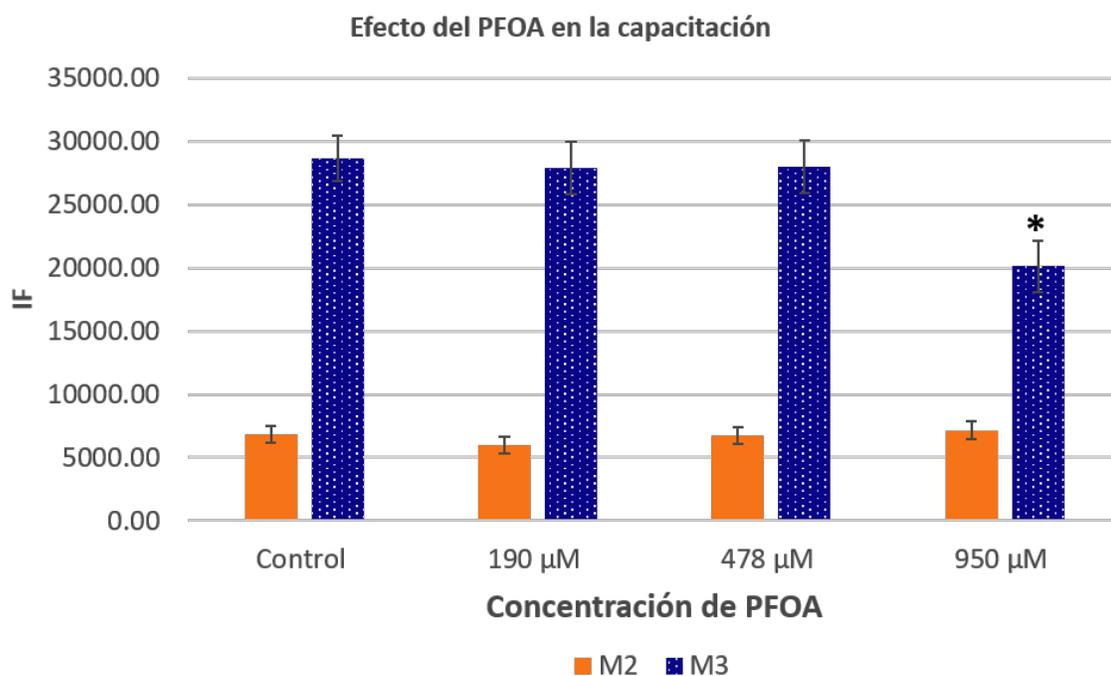


Figura 13. Índice de Fluorescencia (IF) en espermatozoides capacitados *in vitro* con PFOA. M2) grupo de espermatozoides no capacitados, presentan poco Ca^{2+} i, M3) grupo de espermatozoides capacitados y reaccionados, presentan incremento de Ca^{2+} i. PFOA no induce cambios en el Ca^{2+} i de la población M2, sin embargo, PFOA induce disminución del Ca^{2+} i en M3 con la concentración más alta. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Bonferroni. *Diferencias significativas vs. control ($p < 0.05$).

En la RA el IF en M2 fue de 6,415; la incubación con PFOA mostró un IF de 7,320, 5,198 y 15,153 con las diferentes concentraciones de PFOA, se observó incremento significativo con 950 µM de PFOA (Cuadro 11, Figura 14). El IF en M3 fue de 29,131, cuando los espermatozoides se incubaron con 190, 478 y 950 µM de PFOA, se observó un IF de 30,358, 32,928, 12,743 con disminución significativa del IF entre el grupo control y 950 µM de PFOA.

Cuadro 11. Efecto de diferentes concentraciones de PFOA en el Ca^{2+} i de espermatozoides reaccionados *in vitro* marcados con Fluo-3 AM, evaluados con citometría de flujo.

	M2 (IF)	M3 (IF)
Control	6,415 ± 983	29,131 ± 3,293
190 µM	7,320 ± 1,145	30,358 ± 2,407
478 µM	5,198 ± 895	32,928 ± 2,879
950 µM	*15,153 ± 2,762	+12,743 ± 1,101

RA: Reacción acrosomal, IF: Índice de fluorescencia

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ($X \pm E.E$) (n=5).

*Diferencias significativas vs control ($p < 0.05$), +Diferencias significativas vs control ($p < 0.05$)

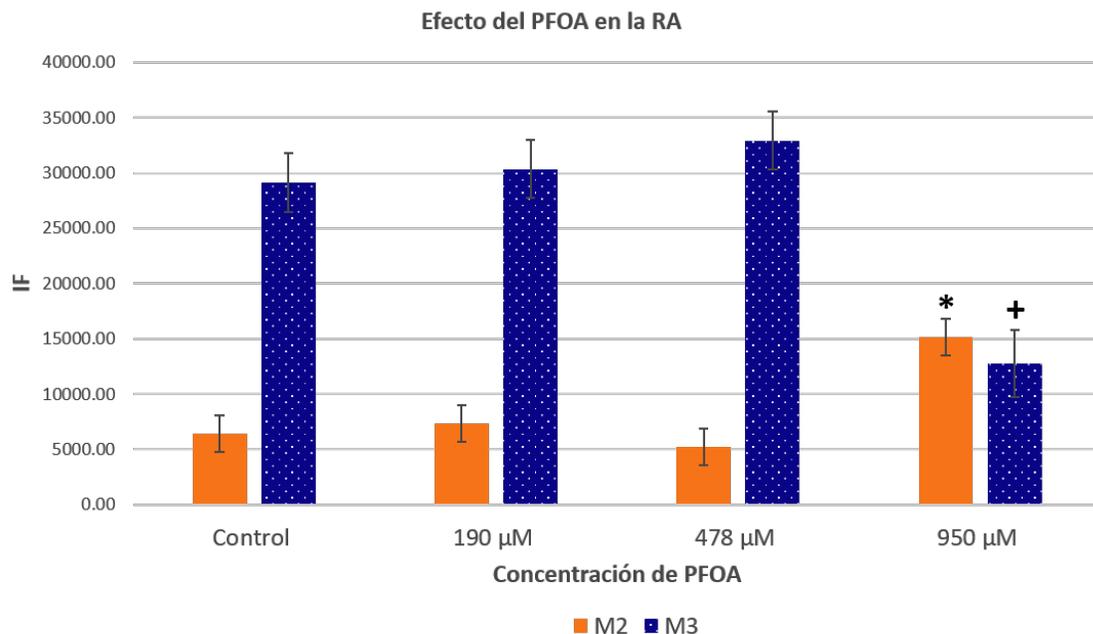


Figura 14. Índice de Fluorescencia (IF) en espermatozoides reaccionados *in vitro* con PFOA. M2) grupo de espermatozoides no capacitados, presentan poco Ca^{2+} i, M3) grupo de espermatozoides capacitados y reaccionados, presentan incremento de Ca^{2+} i. El PFOA a 950 µM induce incremento del Ca^{2+} i en la población M2, mientras que en la población M3 el PFOA

provocó disminución del Ca^{2+}_i , ambos de forma significativa. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar ($X \pm \text{E.E}$) ($n=5$). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey Kramer. *Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$), +Diferencias significativas vs. control ($p<0.05$).

8.6 Efecto del PFOA en la viabilidad espermática evaluado con citometría de flujo

Paralelo a la evaluación del flujo de Ca^{2+}_i en la capacitación y RA con PFOA, se realizó la evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos PI con citometría de flujo, para comprobar los resultados reportados anteriormente con Eosina-Nigrosina (Cuadro 12).

Se observó que en espermatozoides sin capacitar el porcentaje de espermatozoides vivos fue del 91%, cuando se capacitaron se obtuvo una viabilidad del 84% que disminuyó a 75, 73 y 72 % con 190, 478 y 950 μM de PFOA, respectivamente. En la RA se obtuvo una viabilidad del 70% que se mantuvo en 67, 67 y 70% con las diferentes concentraciones de PFOA. No se reportaron diferencias significativas entre tratamientos.

Los resultados anteriores son comparables con los obtenidos con la tinción de E-N, evaluadas con microscopía de campo claro (ver Cuadro 2). El PFOA no causa daño en la viabilidad espermática incluso en concentraciones muy altas, por lo que, la CL_{50} teórica no es real en condiciones experimentales de la capacitación y en la RA.

Cuadro 12. Efecto de diferentes concentraciones de PFOA en la viabilidad de espermatozoides capacitados y reaccionados *in vitro* marcados con PI, evaluados con citometría de flujo.

	Capacitación (%)	RA (%)
Sin capacitar	91 ± 1.78	91 ± 1.78
Control	84 ± 5.74	70 ± 9.06
190 µM	75 ± 10.52	67 ± 10.44
478 µM	73 ± 12.22	67 ± 11.04
950 µM	72 ± 6.832	70 ± 6.60

RA: Reacción acrosomal, PI: Yoduro de propidio

Los datos se presentan como la media ± el error estándar (X ± E.E) (n=5).

Comparación múltiple no mostró diferencias significativas entre grupos (p<0.05)

9 DISCUSIÓN

9.1 Determinación de la CL₅₀

Se determinó la CL₅₀ con el analizador estadístico Probit con datos de espermatozoides vivos obtenidos después de la capacitación con 100, 300 y 600 µM de PFOA. Inicialmente se utilizaron estas concentraciones porque habían sido reportadas previamente en estudios de toxicidad con PFOA (Liao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Por lo anterior, se determinó una CL₅₀ teórica de 954 µM de PFOA, y de acuerdo con esta, se utilizaron las concentraciones 190, 478 y 950 µM de PFOA (CL_{50/5}, CL_{50/2} y CL₅₀) para evaluar su efecto en la viabilidad y en el flujo de Ca²⁺i en la capacitación y en la RA. Al evaluar la viabilidad de espermatozoides incubados con estas tres concentraciones de PFOA, se observó que a dosis tan altas como la de 950 µM de PFOA no es suficiente para matar la mitad de la población espermática, ya que con 950 µM de PFOA se obtuvo un 80% de espermatozoides vivos mientras que en la RA se reportaron el 75% de espermatozoides vivos. Una explicación de la viabilidad a altas concentraciones de PFOA, es que éste sea secuestrado por la albúmina del medio, la cual es una molécula blanco de los compuestos perfluorados (Bischel *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; MacManus-Spencer *et al.*, 2010). La albúmina posee tres dominios (I-III) cada uno compuesto por dos subdominios (A y B). Se ha observado que los compuestos perfluorados tienden a unirse a las regiones hidrofóbicas localizadas en los dominios IIA y IIIA (Sudlow *et al.*, 1976) a través de la formación de complejos PFC's-BSA unidos por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Chen *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que la unión de la albúmina a compuestos perfluorados disminuye el potencial tóxico dentro del organismo (Jones *et al.*, 2003). Ya que en la capacitación espermática *in vitro* se requiere suplementar al medio TALP-HEPES con 6 mg/mL de BSA, es posible que el PFOA se haya unido con la BSA y los efectos tóxico-letales en el espermatozoide se inhibieron durante la capacitación espermática.

Además de la albúmina, se ha reportado que la presencia de Ca^{2+} en el medio de cultivo de neuronas favorece el transporte de PFOA y PFOS a través de la membrana plasmática, potencializando así la toxicidad de estos compuestos perfluorados; asimismo, el incremento excesivo de Ca^{2+} provoca daño oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Liu *et al.*, 2011). Al igual que la BSA, el medio TALP-HEPES contiene Ca^{2+} en forma de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, el cual es indispensable para una capacitación y RA exitosa, sin embargo, en este estudio no se observaron efectos tóxicos del PFOA en la viabilidad espermática en la capacitación y RA. Se sugiere realizar un estudio a fondo del daño oxidativo provocado por PFOA en el espermatozoide.

9.2 Determinación de la CIC_{50}

En este estudio también se evaluó la capacitación de espermatozoides con CTC. La CTC es una molécula fluorescente que se une a cationes divalentes, como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} y Zn^{2+} , que permite el análisis de la estructura de las membranas plasmáticas de acuerdo con la distribución de los cationes en la superficie de membrana (Caswell y Hutchison, 1971). La unión de la CTC a las moléculas de la membrana plasmática del espermatozoide, en específico el Ca^{2+} , muestra una distribución característica del estado fisiológico del espermatozoide, ya sea no capacitado, capacitado o reaccionado (Ward y Storey, 1984).

En este trabajo se reportan cinco patrones de fluorescencia que coinciden con los reportados anteriormente (Figura 7) (Caswell y Hutchison, 1971; Kwon *et al.*, 2014). La evaluación con CTC mostró que la capacitación se mantiene en un porcentaje alto con las diferentes concentraciones de PFOA, sin diferencias estadísticamente significativas, al igual que el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente (es decir, aquellos espermatozoides que reaccionaron sin un estímulo como la progesterona) no cambió en presencia del PFOA (ver Cuadro 3 y 4). El PFOA no causó alteraciones en la capacitación y RA visibles con CTC, por lo que no se logró determinar una CIC_{50} . La CTC es una técnica útil en la evaluación

del estado fisiológico del espermatozoide, sin embargo, no brinda información suficiente del flujo de Ca^{2+} durante la capacitación y RA, por lo cual se utilizó un indicador de Ca^{2+} fluorescente, el Fluo-3 AM.

9.3 Efecto del PFOA en el flujo de Ca^{2+} evaluado con microscopia de epifluorescencia

El Fluo-3 AM es un indicador de Ca^{2+} , permeable a la membrana plasmática de células viables que emite fluorescencia sólo en presencia de Ca^{2+} . La molécula de Fluo-3 AM es un éster acetoximetil que puede pasar libremente a través de la membrana plasmática, dentro de la célula una estereasa no específica hidroliza el éster y libera al Fluo-3. Esta es una molécula que no fluoresce por sí sola, sino que requiere de la unión con Ca^{2+} para emitir una fluorescencia; la longitud de excitación es de 506 nm, mientras que la de emisión es de 525 nm (Bonet *et al.*, 2006). El uso del Fluo-3 AM permitió la identificación de 5 patrones de tinción en los espermatozoides. De acuerdo con los porcentajes obtenidos en condiciones control con espermatozoides sin capacitar, capacitados y reaccionados (ver Cuadro 5), se consideraron a los patrones 1, 2 y 3 como espermatozoides no capacitados, al patrón 4 como espermatozoides capacitados y al patrón 5 como espermatozoides reaccionados (ver Figura 8).

Al igual que los espermatozoides, algunas células somáticas, como las neuronas, requieren del incremento de Ca^{2+} para cumplir con sus funciones biológicas, como la transmisión sináptica y el crecimiento neuronal (Berridge *et al.*, 2003). Se ha reportado que PFOS y PFOA inducen el incremento de Ca^{2+} a través de la apertura de canales de Ca^{2+} Tipo-L que se activan por cambios en el potencial de membrana (Liao *et al.*, 2008). Durante la capacitación y RA del espermatozoide uno de los principales eventos es el incremento de Ca^{2+} . En la capacitación, el Ca^{2+} es importante para activar las cascadas de señalización que dan como resultado cambio en la permeabilidad de la membrana, hiperactivación del flagelo, fosforilación de proteínas y cambios en la distribución de las moléculas en la membrana que

permiten el reconocimiento y fusión con el ovocito, mientras que en la RA se requiere del Ca^{2+} para la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa y la liberación de las enzimas acrosomales (Breitbart, 2002)

De acuerdo con estos patrones de fluorescencia se determinó que la presencia de PFOA en el proceso de capacitación, induce la disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón 4) y el incremento del porcentaje de espermatozoides reaccionados (patrón 5), de forma significativa en ambos eventos. Es probable que PFOA permitió que los espermatozoides se capacitaran y que, eventualmente, reaccionaran de forma acelerada o temprana; esto último apoyado en que se observó disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados debido a que muchos de ellos ya estaban reaccionados. Es probable que PFOA provocó la aceleración del proceso de RA con base a que la inducción de la RA con progesterona en condiciones *in vitro* provoca la exocitosis acrosomal del 30% de espermatozoides de cerdo, mientras que la incubación con PFOA provocó la RA del 49% de los espermatozoides. Es probable que PFOA, de alguna forma, favorezca el incremento sostenido de Ca^{2+} que provoca que las células pasen de un estado capacitado a uno reaccionado, sin embargo la pérdida espontánea o acelerada del acrosoma podría comprometer el proceso de fertilización.

Los espermatozoides poseen una gran variedad de canales iónicos, que incluyen al canal de Ca^{2+} Tipo-L. Este es un canal dependiente de voltaje alto que abre con fuertes despolarizaciones de la membrana; el canal de Ca^{2+} Tipo-L participa en el incremento de Ca^{2+} en la capacitación y RA (Darszon *et al.*, 2005). Con base en nuestros resultados, es posible que PFOA participe en el proceso de capacitación y RA a través de la activación de los canales de Ca^{2+} Tipo-L, debido a cambios en el potencial de membrana, provocados por la presencia de PFOA, que permiten el influjo del Ca^{2+} requerido para completar estos procesos .

Adicional a los canales de Ca^{2+} Tipo-L, existen otros canales de Ca^{2+} que se activan por cambios en el potencial de membrana y que podrían verse estimulados por la

presencia de PFOA. Uno de los canales de Ca^{2+} principales en el espermatozoide es el canal CatSper. Los canales CatSper se ubican en la pieza principal del flagelo y se considera que son primordiales en la capacidad fertilizante del espermatozoide. En ratón, los canales CatSper se activan por voltaje bajo, mientras que en humanos se requiere de mayor voltaje para activarse, si se compara con el voltaje que requieren los espermatozoides de ratón (Miller *et al.*, 2015). CatSper podría activarse por los cambios en el potencial de membrana provocados por PFOA, sin embargo, hasta el año 2015 solo se habían identificado a los canales CatSper en humanos y ratones, por lo que es controversial si PFOA podría afectar a nuestro modelo biológico, el espermatozoide de cerdo.

Otros canales de Ca^{2+} en el espermatozoide de mamífero que se activan por cambios en el potencial de membrana son los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje (Ca_v) que inducen el incremento de Ca^{2+}_i y pueden activarse por voltaje alto (HVA) o por voltaje bajo (LVA) (Darszon *et al.*, 2005). Asimismo, los canales de Ca^{2+} Tipo-L son canales dependientes de voltaje que se activan por voltajes negativos de la membrana (desde -40 a -60 mV) que son provocados por factores capacitantes como la albúmina; estos canales participan en el influjo de Ca^{2+}_i en la capacitación y RA (Espinosa *et al.*, 2000).

Además de los canales de Ca^{2+} , existen otros canales iónicos dependientes de voltaje que regulan la entrada de Ca^{2+} de forma indirecta. Uno de ellos es canal de protones regulado por voltaje (Hv1), el cual se activa por despolarización de la membrana y, se encarga de bombear protones hacia el exterior de la célula que provoca el incremento del pH intracelular e induce la activación de CatSper (Miller *et al.*, 2015). Asimismo en ratones, el canal de potasio específico del espermatozoide SLO3 controla la entrada de Ca^{2+} a través de la activación de CatSper. El canal SLO3 al igual que CatSper se activa por incremento del pH intracelular y abre por despolarización de la membrana. La activación de SLO3 provoca la salida de K^+ del medio intracelular que provoca el incremento del pH intracelular que termina activando a CatSper e induce la hiperpolarización de la membrana característica de

la capacitación espermática (Chávez *et al.*, 2014). Por último los canales intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) y el transportador de Na^+/H^+ (sNHE) también son dependientes de voltaje, participan en la alcalinización del pH intracelular que termina con la activación de los canales CatSper y SLO 3 y, promueven la hiperpolarización de la membrana plasmática en la capacitación (Brenker *et al.*, 2014; Chávez *et al.*, 2014).

Se ha reportado que dosis de 30 a 300 μM de PFC's, como PFOA y PFOS, son suficientes para inducir el incremento de Ca^{2+} i en cultivos de neuronas del hipocampo debido a la liberación del Ca^{2+} de sus almacenes celulares. A pesar de que el mecanismo de liberación del Ca^{2+} de los almacenes de la célula no son claros, se demostró que PFOS y PFOA inducen la liberación de Ca^{2+} a través de la activación del IP_3Rs y RyR, los cuales son dos receptores importantes en la movilización de Ca^{2+} de los almacenes de las células somáticas (Liu *et al.*, 2011). El espermatozoide posee almacenes de Ca^{2+} que se encuentran en: 1) el acrosoma (participa en la exocitosis acrosomal), 2) cuello y pieza media (participa en la regulación flagelar e hiperactivación) y 3) la membrana nuclear (Costello *et al.*, 2009). Los espermatozoides poseen IP_3Rs y RyRs en las membranas de sus almacenes de Ca^{2+} que cuando se activan por su propio ligando (IP_3 y rianodina), cambios en el potencial de membrana, metabolitos u otros segundos mensajeros, provocan la movilización del Ca^{2+} de las reservas intracelulares (Costello *et al.*, 2009).

En la RA, la interacción del espermatozoide con la ZP y progesterona del ovocito activan a receptores de membrana que activan a $\text{PLC}\beta$, la cual es la enzima que hidroliza a PIP_2 , un fosfolípido de la membrana plasmática, para formar IP_3 y DAG. La unión de IP_3 a su receptor en la membrana acrosomal del espermatozoide induce la movilización del Ca^{2+} i almacenado (Breitbart, 2002). Otro mecanismo involucrado en el incremento de Ca^{2+} i es a través de la activación de los canales de Ca^{2+} operados por el almacén (SOC, siglas en inglés) en donde la pérdida o salida de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares activan a los canales SOC de la membrana del espermatozoide e inducen el influjo sostenido de Ca^{2+} extracelular; asimismo durante

la RA, al igual que en la capacitación, se activa el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje Ca_V , que permite la entrada constante de Ca^{2+} durante la RA (Beltrán *et al.*, 2016). Por otro lado el RyRs puede ser activado por el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (CICR, siglas en inglés), el cual moviliza el Ca^{2+} almacenado mediante el estímulo con pequeña cantidad de Ca^{2+} extracelular y ADP ribosa cíclica (Wilding y Dale, 1997).

Por otra parte, se ha reportado que en neuronas el incremento de Ca^{2+}_i provocado por el PFOA causa daño oxidativo a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Liu *et al.*, 2011). A diferencia de las neuronas, en espermatozoides la producción de ROS en cantidades fisiológicas activan cascadas de señalización que regulan la maduración espermática, la capacitación y RA (Gangwar y Atreja, 2015; O'Flaherty, n.d.). Se ha reportado que la inhibición de ROS disminuye la fosforilación de tirosinas de proteínas asociadas en la vaina fibrosa del flagelo, como son las proteínas ancladas a cinasa A (AKAP) PKA, por lo cual, la producción de ROS se asocia al movimiento hiperactivado en la capacitación. No obstante, la sobreproducción de ROS se asocia a fallas en las rutas metabólicas, peroxidación de lípidos y daño al ADN que provoca pérdida de la movilidad y compromete viabilidad espermática (Plessis *et al.*, 2015). Es posible que la presencia de PFOA induzca la capacitación y RA a través de la producción moderada de ROS. Es necesario realizar las investigaciones pertinentes para determinar el efecto del PFOA en la producción de ROS y su participación de la capacitación y RA.

Con base en lo anterior, es posible que PFOA mantenga el proceso de capacitación y favorezca la RA espontánea e inducida a través del incremento de Ca^{2+}_i que se regula por diversos mecanismos que incluyen: cambios en el potencial de membrana, activación del canal de Ca^{2+} Tipo-L, movilización del Ca^{2+}_i de los almacenes intracelulares del espermatozoide a través de la activación de los IP_3R y RyR y, la producción de ROS.

9.4 Efecto del PFOA en la movilidad de espermatozoides capacitados

Se observó que el PFOA provocó disminución del porcentaje y del tamaño de aglutinados de manera dosis-dependiente (ver Cuadro 8). Para que los espermatozoides puedan fertilizar al ovocito, se requiere que los espermatozoides aglutinados en la capacitación sean capaces de liberarse del aglutinado y moverse solos (Monclus y Fornes, 2016). Como se mencionó anteriormente, es posible que PFOA incremente la $[Ca^{2+}]_i$ en la capacitación a través de la activación de canales de Ca^{2+} y, ya que la aglutinación y desaglutinación de los espermatozoides requiere de Ca^{2+} , es posible que PFOA favorezca la disgregación de los espermatozoides de manera dosis dependiente; a 950 μ M de PFOA es más evidente la disgregación de los aglutinados y el desplazamiento de los espermatozoides hiperactivados en grupos pequeños.

Se ha observado que paralelo a los cambios en la movilidad espermática (hiperactivación), la fosforilación de proteínas y en la distribución de los componentes de la membrana plasmática, la aglutinación (usualmente de tipo cabeza-cabeza) es otro de los eventos relacionados con la capacitación espermática (Harayama *et al.*, 1994). Nuevamente, el Ca^{2+} es fundamental para la aparición de este evento en la capacitación espermática. En reportes previos se observó que el porcentaje de espermatozoides de cerdo aglutinados en medio de bicarbonato Krebs-Ringer modificado (mKRB) incrementa en presencia de Ca^{2+} y HCO_3^- de manera dosis dependiente y que además, el uso de queladores provoca disminución de la aglutinación; sin embargo, el efecto inhibitor de los queladores se revierte con el uso de AMPc o dibutil AMPc, un agonista de AMPc. El Ca^{2+} extracelular, al igual que el Ca^{2+} liberado de los almacenes espermáticos induce la aglutinación espermática (Harayama *et al.*, 2003, 2000, 1998). De igual forma, la adición de albumina sérica de porcino (PSA), de bovino (BSA) o metil-beta-ciclodextrina (MBC), un aceptor de colesterol, favorecen el incremento del porcentaje de espermatozoides aglutinados a través de la activación de los canales de Ca^{2+} membranales. Al igual que los

queladores de Ca^{2+} y HCO_3^- , la adición de antagonistas de AMPc o H-89, un inhibidor de PKA, provocan disminución de la aglutinación (Harayama *et al.*, 2000).

Además de las moléculas que soportan o favorecen la capacitación, la aglutinación de espermatozoides de cerdo se asocia a proteínas conocidas como anti-aglutininas, que son proteínas que se producen en el cuerpo y cola del epidídimo principalmente, y se adicionan al espermatozoide durante la maduración epididimaria y, en la eyaculación en el fluido seminal (Harayama *et al.*, 1994). En el espermatozoide, las anti-aglutininas se localizan en la región acrosomal y ecuatorial y, evitan que el espermatozoide se aglutine mientras se encuentran en el tracto reproductor masculino. Sin embargo, durante la capacitación las anti-aglutininas se liberan de la membrana del espermatozoide por efecto de los factores capacitantes y se induce la aglutinación espermática de tipo cabeza-cabeza (Harayama y Kato, 2001).

El mecanismo de señalización de la aglutinación no es claro, sin embargo, se considera que la aglutinación de espermatozoides de cerdo también es un marcador de capacitación y se regula por factores que inducen la capacitación, como el Ca^{2+} , aceptores de esteroides (albúmina y ciclodextrinas), HCO_3^- y a la activación de cascadas de señalización reguladas por AMPc (Harayama, 2013, 2013, Harayama *et al.*, 2003, 2000, 1998, 1994; Harayama y Kato, 2001).

Se requiere realizar ensayos adicionales para evaluar a detalle la aglutinación espermática en la capacitación con las diferentes concentraciones de PFOA, y en diferentes momentos durante el transcurso de las 4h de capacitación para confirmar nuestras observaciones. Se sugiere realizar la técnica propuesta por Harayama (Harayama *et al.*, 1994) para determinar porcentaje de espermatozoides aglutinados y tipo de aglutinación.

Uno de los eventos de la capacitación es la adquisición de la movilidad hiperactivada que se caracteriza por el bateo del flagelo de forma asimétrica y vigorosa, amplitud en el desplazamiento lateral de la cabeza y trayectoria errática o circular (Armon y Eisenbach, 2011; Ho y Suarez, 2001; Suarez y Ho, 2003). La hiperactivación es

importante en el proceso de fertilización porque permite al espermatozoide moverse a través del microambiente viscoso del oviducto y penetrar la ZP (Armon y Eisenbach, 2011). En mamíferos, el movimiento hiperactivado se regula por la homeostasis iónica flagelar y la producción de ATP; nuevamente el Ca^{2+} es de gran importancia en la regulación del movimiento del flagelo. El principal canal iónico específico de espermatozoides involucrado en el incremento continuo de Ca^{2+} en el flagelo es el canal CatSper que se encuentra en la pieza principal del flagelo y se activa por cambios en el voltaje de la membrana, causado por el incremento del pH intracelular debido a la salida de protones. La activación de CatSper, además de regularse por cambios en el potencial de membrana, se activa por glicoproteínas de la ZP, fosforilación en tirosinas de proteínas del flagelo y progesterona (Gangwar y Atreja, 2015). Se ha observado que la pérdida de la expresión del gen *CatSper1* o el daño en cualquiera de sus 7 subunidades causa una completa infertilidad debido a la falta de hiperactivación del flagelo (Miller *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2001; Ren and Xia, 2010).

Respecto a la hiperactivación, en la capacitación espermática con las diferentes concentraciones de PFOA no se observaron cambios en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados, los cuales se mantuvieron en un porcentaje alto desde 88% en el control a 85% con 950 μM de PFOA (ver Cuadro 8). Como se ha indicado previamente, existe evidencia reportada por otros autores que indican que PFOA favorece el incremento del Ca^{2+} i, a través de diversos mecanismos; el Ca^{2+} es indispensable para la hiperactivación del espermatozoide, por lo que no se observaron disturbios en la adquisición de la movilidad hiperactivada, sin embargo, se sugiere realizar investigaciones respecto a la hiperactivación, como lo es, fosforilación de proteínas del flagelo y un análisis cuantitativo del movimiento individual de los espermatozoides con un análisis computarizado (sistema CASA), con el fin de comprender el rol del PFOA en la hiperactivación.

9.5 Efecto del PFOA en el flujo de Ca^{2+} evaluado con citometría de flujo.

A diferencia de la microscopia de epifluorescencia, donde se determinó la distribución de Ca^{2+} del espermatozoide, la evaluación con citometría de flujo permitió determinar, cuantitativamente, el efecto del PFOA en el flujo de Ca^{2+} en la capacitación y en la RA de una gran cantidad de espermatozoides (20,000), a través de la medición del índice de fluorescencia (IF), que proporciona un valor representativo del Ca^{2+} en el espermatozoide. El análisis con citometría de flujo ofrece la posibilidad de evaluar varios parámetros de forma simultánea y cuantitativa en células individuales, dentro de grandes poblaciones de células mediante el uso de indicadores fluorescentes; los resultados obtenidos son representativos y con menor variabilidad entre ellos.

Se determinaron dos poblaciones espermáticas positivas a Fluo-3 AM: M2 y M3. Existe una tercera población, M1, que no se consideró en el análisis debido a que es la población negativa a Fluo-3 AM o autofluorescencia de espermatozoides sin teñir. Se consideró a M2 como la población de espermatozoides sin capacitar, con base en que fue la única población que se detectó en una muestra de espermatozoides sin capacitar (Figura 11) y en que el IF es pequeño (11,022) si se compara con el IF de las poblaciones formadas en espermatozoides capacitados y reaccionados (ver Cuadro 9). En controles de capacitación y RA, además de la formación de la población M2, se formó la población M3, con un IF de 28,636 en la capacitación y un IF de 29,130 en la RA, que pueden considerarse altos si se compara con el IF de M2 de 11,022 de una muestra sin capacitar. En este caso, se consideró a M3 como la población de espermatozoides capacitados y reaccionados.

En la capacitación espermática con las diferentes concentraciones de PFOA se observó disminución del IF en M3 desde 28,636 en el control a 20,116 con 950 μM de PFOA (ver Cuadro 10). Con base a los resultados anteriores, y considerando que con microscopia de epifluorescencia se observó que el porcentaje de

espermatozoides capacitados disminuye significativamente con 950 μM de PFOA debido al incremento del porcentaje de espermatozoides reaccionados de forma espontánea, los resultados, con ambas técnicas indican que el incremento de Ca^{2+} inducido por PFOA provoca que los espermatozoides pasen de un estado capacitado a uno reaccionado, debido a la liberación del Ca^{2+} de los almacenes intracelulares del espermatozoide, principalmente el acrosoma.

En la RA se observa un comportamiento similar a la capacitación (ver Cuadro 11). La RA con las diferentes concentraciones de PFOA mostró disminución del IF en M3 desde 29,130 en el control a 12,742 con 950 μM PFOA de manera significativa. Con base en los resultados obtenidos con microscopia de epifluorescencia con Fluo-3 AM, donde se observó un incremento significativo del porcentaje de espermatozoides reaccionados (49%) a 950 μM de PFOA, se determinó que el estímulo producido por la presencia de progesterona en el medio más el efecto del PFOA en el flujo de Ca^{2+} “potencializan” o “favorecen” la RA, de tal forma que se observó una disminución del IF en la RA, debido a la pérdida de los almacenes de Ca^{2+} intracelulares (acrosoma, principalmente). Un resultado interesante en la RA fue el incremento del IF en M2 con 950 μM de PFOA; no se consideraron espermatozoides sin capacitar, como se había establecido en un principio, porque el IF en espermatozoides control en M2 en la RA fue de 6,414, mientras que con 950 μM incrementó a 15,153. Es posible que el PFOA provocó en esa población atraso o retardo en el proceso de capacitación y RA, de tal forma que el Ca^{2+} no incrementó lo suficiente como para alcanzar el IF reportado en M3, es decir, se trata de una población diferente a la observada en M2 que está en vías de capacitación o RA. Se sugiere realizar ensayos adicionales para comprender el efecto de PFOA en la población M2 durante la RA con altas concentraciones de PFOA.

9.6 Efecto del PFOA en la viabilidad espermática evaluado con citometría de flujo.

Paralelo a la evaluación del Ca^{2+} con citometría de flujo, se realizó la evaluación de la viabilidad con Yoduro de propidio (IP). El IP es un colorante fluorescente que tiñe ácidos nucleicos; es útil en la identificación de células no viables o en procesos temprano de apoptosis. Se observó que el PFOA no provocó disminución de la viabilidad en ambos procesos; la viabilidad se mantiene entre 72% y 73% en la capacitación y entre 67% y 70% en la RA con las tres concentraciones de PFOA. Entre las ventajas que ofrece la evaluación con citometría de flujo es que proporciona datos precisos en una gran cantidad de células; el análisis en una población grande de células (20,000 células) disminuye la variabilidad de los datos. Los resultados obtenidos con IP son comparables con las viabilidades reportadas con eosina-nigrosina donde la viabilidad se mantiene entre 80% y 87% en la capacitación y entre 75% y 84% en la RA con las diferentes concentraciones de PFOA. Las dos evaluaciones, microscopia de campo claro y citometría de flujo, indican que PFOA no compromete la viabilidad de los espermatozoides inclusive con concentraciones muy altas de PFOA.

Con base a lo reportado previamente de PFOA y a lo observado en las diferentes evaluaciones espermáticas en la capacitación y RA en este trabajo, PFOA tiene la capacidad de inducir incremento de Ca^{2+} i posiblemente a través de diversas vías, una de ellas podría ser la activación canales de Ca^{2+} i Tipo-L, que incrementan el influjo de Ca^{2+} extracelular y que a su vez, este Ca^{2+} estimula la liberación del Ca^{2+} i de las reservas de Ca^{2+} intracelulares; por otro lado, PFOA podría provocar cambios en el potencial de membrana que puede activar a los IP_3R y RyR , la activación de ambos receptores son importantes en la movilización del Ca^{2+} de los almacenes de Ca^{2+} en el espermatozoide (Liu *et al.*, 2011). En la capacitación, el posible cambio en el potencial de membrana, el influjo de Ca^{2+} extracelular y la producción de ROS provocadas por el PFOA, podrían activar las vías de señalización involucradas en la capacitación y predisponer de forma acelerada o prematura la RA.

El movimiento hiperactivado y la aglutinación son eventos dependientes del incremento de Ca^{2+} i, que aparentemente, se favorecieron con el PFOA. En la RA uno de los eventos principales es el incremento de Ca^{2+} i provocado por la movilización de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Breitbart, 2002); en condiciones *in vitro*, la movilización de Ca^{2+} i es inducida por la presencia de progesterona que activa a PLC que produce a IP_3 y puede unirse a su receptor en la membrana del acrosoma y demás almacenes intracelulares del espermatozoide, sin embargo, PFOA puede activar a IP_3 R y RyR por cambios en el potencial de membrana e inducir la RA de forma espontánea, es decir, sin el estímulo de progesterona, glicoproteínas de la ZP, ionóforos Ca^{2+} o algún otro inductor de la RA. Los resultados con citometría de flujo, demuestran que PFOA participa en la liberación del Ca^{2+} de los almacenes intracelulares del espermatozoide, que se refleja en la disminución del Ca^{2+} i en la capacitación y RA con PFOA.

El diagrama presentado en la Figura 15 se muestra cómo el PFOA podría inducir el incremento de Ca^{2+} i en la capacitación; mientras que en la Figura 16 se muestra su posible efecto del PFOA en la RA.

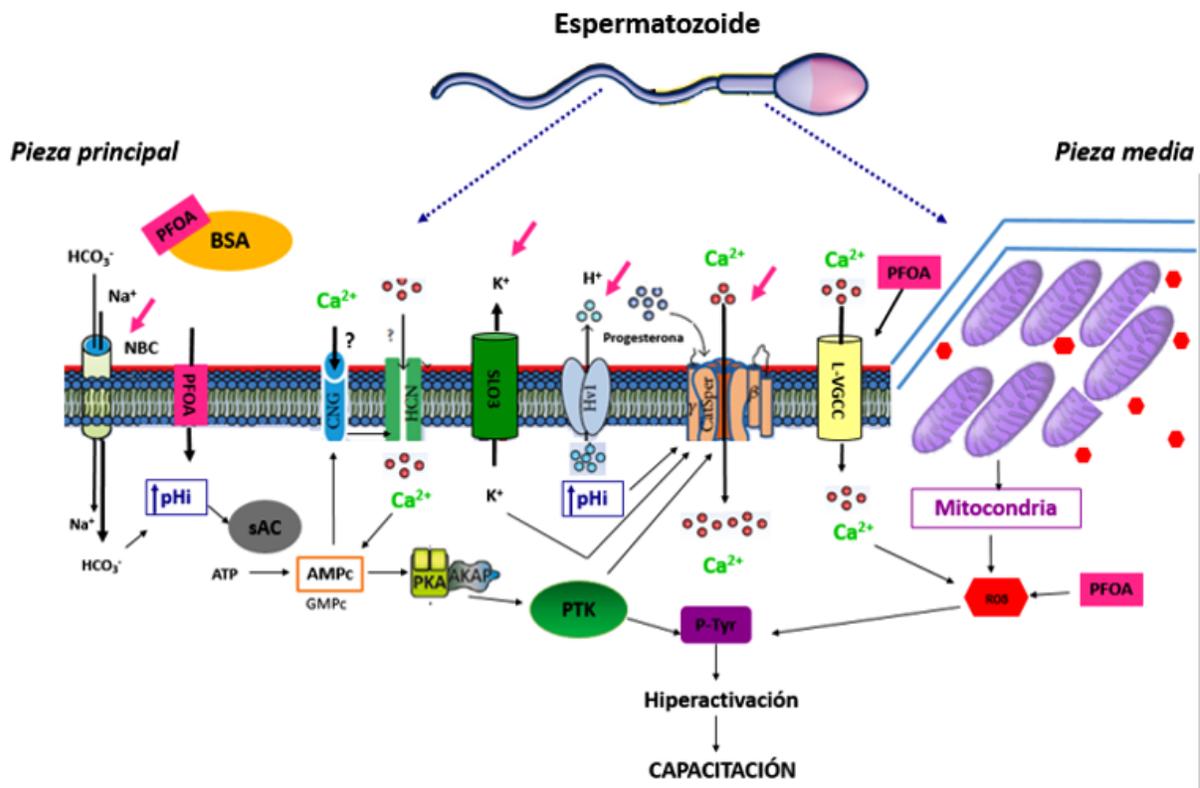


Figura 15. Posible participación de PFOA en el incremento de Ca^{2+} en capacitación espermática. La albúmina sérica de bobino (BSA) del medio extracelular puede formar complejos con PFOA, que podrían inhibir el efecto tóxico del PFOA. El PFOA por ser una molécula anfifílica podría atravesar libremente la membrana plasmática y provocar diversos efectos (ver más adelante). El PFOA puede provocar cambios en el potencial de membrana que podría activar diferentes canales iónicos dependientes de voltaje (señalados con flechas rosas) como el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), el canal de potasio específico de espermatozoides (SLO3) y el canal de protones regulado por voltaje (Hv1), estos últimos provocan incremento del pH intracelular (pHi) y cambios en el potencial de membrana que inducen la activación del principal canal de Ca^{2+} , CatSper que mantiene el influjo sostenido de Ca^{2+} durante la capacitación; asimismo PFOA podría inducir el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de la activación del Ca^{2+} regulado por voltaje tipo-L (L-VGCC). Durante la capacitación espermática el incremento del pHi y de Ca^{2+} activan a adenilato ciclasa soluble (sAC) que produce a adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que junto con guanósín monofosfato cíclico (GMPc) activan al canal de Ca^{2+} regulado por nucleotidos cíclicos (CNG), el cual también permite el influjo de Ca^{2+} extracelular; este último activa al canales iónico regulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN). AMPc activa a la proteína cinasa A

(PKA) que se encuentra en ligado a la proteína de anclaje a proteína cinasa A (AKAP) y participan en la fosforilación de proteínas cinasas de tirosinas (PTK), la cual fosforila en residuos de tirosinas de proteínas involucradas en el movimiento hiperactivado en la capacitación; de igual forma PKA participa en la activación de CatSper. Por otra parte, la mitocondria en la capacitación produce especies reactivas de oxígeno (ROS), asimismo PFOA a través del incremento de Ca^{2+} , podría favorecer la producción de ROS y favorecer la capacitación mediante la fosforilación de proteínas. Modificado de (Rahman *et al.*, 2014).

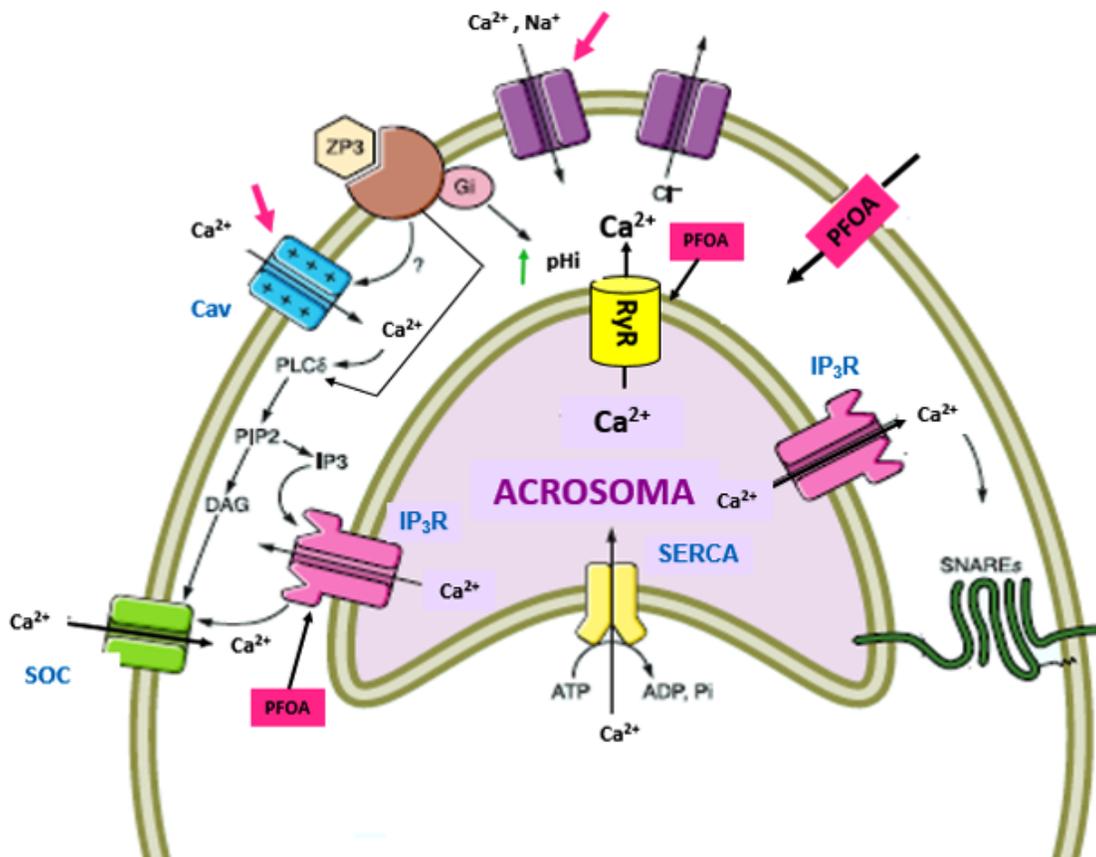


Figura 16. Posible participación de PFOA en el incremento de Ca^{2+} i en la RA. En la RA la unión de la ZP3 a su receptor induce el incremento del pH intracelular (pHi) y de Ca^{2+} i a través de la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) que mantienen el influjo de Ca^{2+} extracelular sostenido en la RA. El PFOA podría activar diversos canales iónicos dependientes de voltaje a través de cambios en el potencial de membrana como al canal Ca_v y canales de Na^+ (señalados con flechas rosas). Asimismo el incremento de Ca^{2+} i y la activación de la proteína G_q activan a PLC que hidroliza a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) para producir inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). IP_3 se une a su receptor (IP_3R) en la membrana

acrosomal externa e induce la movilización del Ca^{2+} almacenado en el acrosoma; de igual forma, PFOA podría activar al IP_3R y al receptor de rianodina (RyR) a través de cambios en el potencial de membrana e inducir el incremento de Ca^{2+} debido a la salida de Ca^{2+} del acrosoma y a la activación de los canales de Ca^{2+} operados por el almacén (SOC). A su vez, el incremento de Ca^{2+} activa a las proteínas involucradas en la fusión de membranas en la RA como las proteínas SNARE. Las concentraciones bajas de Ca^{2+} dentro del acrosoma se regulan por la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (SERCA) que mantiene el influjo de Ca^{2+} hacia dentro del acrosoma durante el proceso de RA. Modificado de (Darszon et al., 2011).

10 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que altas concentraciones de PFOA no comprometen la viabilidad espermática en el proceso de capacitación y RA *in vitro*. Sin embargo, se observó que inclusive en altas concentraciones, el PFOA favorece el incremento de Ca^{2+}_i que se refleja en el mantenimiento de un alto porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados evaluados con CTC; concentraciones altas de PFOA permiten la hiperactivación de una gran población de espermatozoides y la disgregación de los aglutinados formados en condiciones control. La evaluación con indicador de Ca^{2+}_i Fluo-3 AM con microscopia de epifluorescencia mostró que PFOA provoca disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados debido a un incremento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados, es decir, PFOA induce la RA espontánea y favorece la RA inducida. Del mismo modo, la evaluación con citometría de flujo demostró que altas concentraciones de PFOA provocan disminución en el Ca^{2+}_i , tanto en la capacitación como en la RA, debido a la pérdida de los acrosomas en la RA espontánea e inducida, provocados por la movilización del Ca^{2+}_i de los almacenes intracelulares del espermatozoide.

En células somáticas, la acumulación de Ca^{2+} por influjo extracelular y por la liberación interna de los almacenes, puede causar disfunción celular; la célula requiere de mecanismos de regulación de la concentración iónica que mantengan la funcionalidad celular. En el caso de los espermatozoides, el incremento de Ca^{2+}_i provocado por PFOA estimuló la capacitación y RA de los espermatozoides, inclusive con concentraciones que resultarían letales para otras células, sin embargo, el incremento de la RA espontánea e inducida es posible que comprometa la capacidad fertilizante del espermatozoide al perder de forma temprana las enzimas involucradas en la fertilización del ovocito.

11 PERSPECTIVAS

En este trabajo se propone que PFOA incrementa el Ca^{2+}_i mediante la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares a través de la activación de IP_{3R} y RyR . Se sugiere realizar un estudio a fondo de los canales iónicos involucrados en el incremento de Ca^{2+}_i , que incluyen canales de membrana plasmática y de almacenes intracelulares en el acrosoma, mitocondria y membrana redundante nuclear.

La aglutinación es un proceso que depende de factores capacitantes como la BSA, Ca^{2+} , HCO_3^- y cascadas de señalización reguladas por AMPc, sin embargo, el mecanismo de señalización no es comprendido por completo. En este trabajo se observaron cambios importantes en la aglutinación, sin embargo, sería conveniente describir las características de la aglutinación espermática, como el tipo de aglutinación (p.e. cabeza-cabeza, cabeza-flagelo), porcentaje de espermatozoides aglutinados, tamaño y por tanto proteínas involucradas.

La capacitación y RA son eventos complejos que pueden ser evaluados en diversos niveles. Se sugiere realizar evaluaciones adicionales a las realizadas en este proyecto que comprueben el efecto del PFOA en ambos procesos, que incluyen: cambios en el potencial de membrana, cambios en el pH_i , participación de ROS en la inducción de la capacitación y RA, fosforilación de tirosinas de proteínas y polimerización y despolimerización de actina.

Se observó que PFOA no compromete la viabilidad espermática e induce la capacitación y RA, no obstante, no se conoce si los espermatozoides tratados con PFOA son capaces de fertilizar un ovocito. Se propone realizar experimentos de fertilización *in vitro* que comprueben la capacidad fertilizante del espermatozoide después de la capacitación con altas concentraciones de PFOA.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Abou-haila, A., Tulsiani, D.R.P., 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 72–81. doi:10.1016/j.abb.2009.02.003
- Andersen, M.E., Butenhoff, J.L., Chang, S.-C., Farrar, D.G., Kennedy, G.L., Lau, C., Olsen, G.W., Seed, J., Wallace, K.B., 2008. Perfluoroalkyl acids and related chemistries--toxicokinetics and modes of action. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 102, 3–14. doi:10.1093/toxsci/kfm270
- Armon, L., Eisenbach, M., 2011. Behavioral Mechanism during Human Sperm Chemotaxis: Involvement of Hyperactivation. *PLOS ONE* 6, e28359. doi:10.1371/journal.pone.0028359
- Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M., Forti, G., 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 12, 323–330.
- Bedu-Addo, K., Costello, S., Harper, C., Machado-Oliveira, G., Lefievre, L., Ford, C., Barratt, C., Publicover, S., 2008. Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm--a mechanism for regulation of flagellar activity. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 615–626. doi:10.1387/ijdb.072535kb
- Belleannee, C., Belghazi, M., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.-P., Gatti, J.L., Dacheux, J.-L., Dacheux, F., 2011. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *PROTEOMICS* 11, 1952–1964. doi:10.1002/pmic.201000662
- Beltrán, C., Treviño, C.L., Mata-Martínez, E., Chávez, J.C., Sánchez-Cárdenas, C., Baker, M., Darszon, A., 2016. Role of Ion Channels in the Sperm Acrosome Reaction, in: Buffone, M.G. (Ed.), *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization, Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology.* Springer International Publishing, pp. 35–69.
- Berger, T., 1990. Changes in exposed membrane proteins during in vitro capacitation of boar sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 27, 249–253. doi:10.1002/mrd.1080270311
- Berridge, M.J., 2009. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 933–940. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.005
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529. doi:10.1038/nrm1155
- Betancourt, M., Reséndiz, A., Fierro, E.C.Y.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. Elmsford N* 22, 508–512. doi:10.1016/j.reprotox.2006.03.001
- Biegel, L.B., Hurtt, M.E., Frame, S.R., O'Connor, J.C., Cook, J.C., 2001. Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 60, 44–55.

- Biegel, L.B., Liu, R.C., Hurtt, M.E., Cook, J.C., 1995. Effects of ammonium perfluorooctanoate on Leydig cell function: in vitro, in vivo, and ex vivo studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134, 18–25. doi:10.1006/taap.1995.1164
- Bischel, H.N., MacManus-Spencer, L.A., Luthy, R.G., 2010. Noncovalent Interactions of Long-Chain Perfluoroalkyl Acids with Serum Albumin. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5263–5269. doi:10.1021/es101334s
- Bonet, S., Red Temática Nacional de Reproducción Porcina, Universitat de Girona, Servei de Publicacions, 2006. Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino: biotecnología de la reproducción porcina. Universitat de Girona. Servei de Publicacions, Girona.
- Bonilla, E., Hernández, F., Cortés, L., Mendoza, M., Mejía, J., Carrillo, E., Casas, E., Betancourt, M., 2008. Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early oogenesis in mice in vitro. *Environ. Toxicol.* 23, 240–245. doi:10.1002/tox.20332
- Breitbart, H., 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187, 139–144.
- Breitbart, H., Lax, J., Rotem, R., Naor, Z., 1992. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem. J.* 281, 473–476. doi:10.1042/bj2810473
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., Breitbart, H., 2003. Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. *Biol. Reprod.* 68, 837–845. doi:10.1095/biolreprod.102.009233
- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N.D., Naruse, M., Krähling, M., Müller, A., Kaupp, U.B., Strünker, T., 2012. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm: CatSper: a polymodal chemosensor. *EMBO J.* 31, 1654–1665. doi:10.1038/emboj.2012.30
- Brenker, C., Zhou, Y., Müller, A., Echeverry, F.A., Trötschel, C., Poetsch, A., Xia, X.-M., Bönigk, W., Lingle, C.J., Kaupp, U.B., Strünker, T., 2014. The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *eLife* 3, e01438. doi:10.7554/eLife.01438
- Buffone, M.G., Ijiri, T.W., Cao, W., Merdushev, T., Aghajanian, H.K., Gerton, G.L., 2012. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol. Reprod. Dev.* 79, 4–18. doi:10.1002/mrd.21393
- Buffone, M.G., Wertheimer, E.V., Visconti, P.E., Krapf, D., 2014. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, The role of soluble adenylyl cyclase in health and disease 1842, 2610–2620. doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.013
- Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Tully, J.S., Needham, L.L., 2007. Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the u.s. population: data from the national health and nutrition examination survey (NHANES). *Environ. Sci. Technol.* 41, 2237–2242.

- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., Brini, M., 2001. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36, 107–260. doi:10.1080/20014091074183
- Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Betancourt, M., 2010. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicol. In Vitro* 24, 224–230. doi:10.1016/j.tiv.2009.09.004
- Caswell, A.H., Hutchison, J.D., 1971. Visualization of membrane bound cations by a fluorescent technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 43–49. doi:10.1016/0006-291X(71)90359-7
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., Drevet, J.R., 2010. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J. Anim. Sci.* 88, 1321–1331. doi:10.2527/jas.2009-2583
- Chaloupka, J.A., Bullock, S.A., Iourgenko, V., Levin, L.R., Buck, J., 2006. Autoinhibitory regulation of soluble adenylyl cyclase. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 361–368. doi:10.1002/mrd.20409
- Chávez, J.C., Ferreira, J.J., Butler, A., Beltrán, J.L.D.L.V., Treviño, C.L., Darszon, A., Salkoff, L., Santi, C.M., 2014. SLO3 K⁺ Channels Control Calcium Entry through CATSPER Channels in Sperm. *J. Biol. Chem.* 289, 32266–32275. doi:10.1074/jbc.M114.607556
- Chen, H., He, P., Rao, H., Wang, F., Liu, H., Yao, J., 2015. Systematic investigation of the toxic mechanism of PFOA and PFOS on bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling. *Chemosphere, Per- and Polyfluorinated Alkyl substances (PFASs) in materials, humans and the environment – current knowledge and scientific gaps.* 129, 217–224. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.040
- Chen, H., Zhang, C., Han, J., Yu, Y., Zhang, P., 2012. PFOS and PFOA in influents, effluents, and biosolids of Chinese wastewater treatment plants and effluent-receiving marine environments. *Environ. Pollut.* 170, 26–31. doi:10.1016/j.envpol.2012.06.016
- Chen, W.-Y., Ni, Y., Pan, Y.-M., Shi, Q.-X., Yuan, Y.-Y., Chen, A.-J., Mao, L.-Z., Yu, S.-Q., Roldan, E.R.S., 2005. GABA, progesterone and zona pellucida activation of PLA2 and regulation by MEK-ERK1/2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *FEBS Lett.* 579, 4692–4700. doi:10.1016/j.febslet.2005.06.090
- Cheon, K.W., Choi, Y.J., Byun, H.K., Hong, J.Y., Choi, H.K., Seo, J.T., 2004. Expression of sperm-specific cation channel CatSper in human spermatozoa. *Korean J Urol* 45, 365–372.
- Cisneros-Mejorado, A., Hernández-Soberanis, L., Islas-Carbajal, M.C., Sánchez, D., 2014. Capacitation and Ca²⁺ influx in spermatozoa: role of CNG channels and protein kinase G. *Andrology* 2, 145–154. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00169.x

- Cook, J.C., Murray, S.M., Frame, S.R., Hurtt, M.E., 1992. Induction of Leydig cell adenomas by ammonium perfluorooctanoate: a possible endocrine-related mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113, 209–217.
- Cooper, T.G., 2005. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum. Reprod.* 20, 9–11. doi:10.1093/humrep/deh555
- Correia, J., Michelangeli, F., Publicover, S., 2015. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction* 150, R65–R76. doi:10.1530/REP-15-0102
- Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., Barratt, C., Kirkman-Brown, J., Publicover, S., 2009. Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction* 138, 425–437. doi:10.1530/REP-09-0134
- Da Silva, N., Piétrement, C., Brown, D., Breton, S., 2006. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Aquaporins* 1758, 1025–1033. doi:10.1016/j.bbamem.2006.06.026
- Dacheux, J.-L., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.-P., Ecroyd, H., Druart, X., Gatti, J.-L., Dacheux, F., 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 197–210. doi:10.3109/19396368.2012.663233
- Dacheux, J.-L., Dacheux, F., 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 147, R27–R42. doi:10.1530/REP-13-0420
- Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., Hernández-González, E.O., Nishigaki, T., Treviño, C.L., Wood, C., Beltrán, C., 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131, 977–988. doi:10.1530/rep.1.00612
- Darszon, A., Hernández-Cruz, A., 2014. T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells and sperm. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 466, 819–831. doi:10.1007/s00424-014-1478-2
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., Treviño, C.L., 2011. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol. Rev.* 91, 1305–1355. doi:10.1152/physrev.00028.2010
- Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C.L., Felix, R., Beltrán, C., 2005. Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int. Rev. Cytol.* 243, 79–172. doi:10.1016/S0074-7696(05)43002-8
- Darszon, A., Sánchez-Cárdenas, C., Orta, G., Sánchez-Tusie, A.A., Beltrán, C., López-González, I., Granados-González, G., Treviño, C.L., 2012. Are TRP channels involved in sperm development and function? *Cell Tissue Res.* 349, 749–764. doi:10.1007/s00441-012-1397-5
- Darszon, A., Treviño, C.L., Wood, C., Galindo, B., Rodríguez-Miranda, E., Acevedo, J.J., Hernandez-González, E.O., Beltrán, C., Martínez-López, P., Nishigaki, T., 2007. Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 229–244.
- Demarco, I.A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., Vega-Beltrán, J.L. de la, Hockensmith, J.W., Kopf, G.S., Darszon, A., Visconti, P.E., 2003. Involvement

- of a Na⁺/HCO Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *J. Biol. Chem.* 278, 7001–7009. doi:10.1074/jbc.M206284200
- Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M., Betancourt, M., 2009. In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 623–633. doi:10.1007/s10565-008-9117-3
- Emmett, E.A., Shofer, F.S., Zhang, H., Freeman, D., Desai, C., Shaw, L.M., 2006. Community exposure to perfluorooctanoate: relationships between serum concentrations and exposure sources. *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 48, 759–770. doi:10.1097/01.jom.0000232486.07658.74
- Espinosa, F., López-González, I., Muñoz-Garay, C., Felix, R., De la Vega-Beltrán, J.L., Kopf, G.S., Visconti, P.E., Darszon, A., 2000. Dual regulation of the T-type Ca²⁺ current by serum albumin and β -estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett.* 475, 251–256. doi:10.1016/S0014-5793(00)01688-4
- Fàbrega, A., Puigmulé, M., Dacheux, J.-L., Bonet, S., Pinart, E., 2012. Glycocalyx characterisation and glycoprotein expression of *Sus domesticus* epididymal sperm surface samples. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 619–630.
- Fei, C., McLaughlin, J.K., Lipworth, L., Olsen, J., 2009. Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24, 1200–1205. doi:10.1093/humrep/den490
- Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J.A., Shabanowitz, J., Herr, J.C., Hunt, D.F., Visconti, P.E., 2003. Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm EVIDENCE OF TYROSINE PHOSPHORYLATION OF A KINASE-ANCHORING PROTEIN 3 AND VALOSIN-CONTAINING PROTEIN/p97 DURING CAPACITATION. *J. Biol. Chem.* 278, 11579–11589. doi:10.1074/jbc.M202325200
- Fierro, R., Bonilla, E., Casas, E., Jiménez, I., Ducolomb, Y., Betancourt, M., 1994. Inhibition of pig oocyte in vitro fertilization by the action of components of the zona pellucida. *Theriogenology* 42, 227–234.
- Finkelstein, M., Etkovitz, N., Breitbart, H., 2010. Role and Regulation of Sperm Gelsolin Prior to Fertilization. *J. Biol. Chem.* 285, 39702–39709. doi:10.1074/jbc.M110.170951
- Finkelstein, M., Megnagi, B., Ickowicz, D., Breitbart, H., 2013. Regulation of sperm motility by PIP2(4,5) and actin polymerization. *Dev. Biol.* 381, 62–72. doi:10.1016/j.ydbio.2013.06.014
- Florman, H.M., Jungnickel, M.K., Sutton, K.A., 2008. Regulating the acrosome reaction. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 503–510. doi:10.1387/ijdb.082696hf
- Flowers, W.L., 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 67–78.
- Fouchécourt, S., Charpigny, G., Reinaud, P., Dumont, P., Dacheux, J.-L., 2002. Mammalian Lipocalin-Type Prostaglandin D2 Synthase in the Fluids of the Male Genital Tract: Putative Biochemical and Physiological Functions. *Biol. Reprod.* 66, 458–467. doi:10.1095/biolreprod66.2.458

- Fromme, H., Tittlemier, S.A., Völkel, W., Wilhelm, M., Twardella, D., 2009. Perfluorinated compounds – Exposure assessment for the general population in western countries. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212, 239–270. doi:10.1016/j.ijheh.2008.04.007
- Gadella, B.M., Harrison, R.A., 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127, 2407–2420.
- Gadella, B.M., Tsai, P.-S., Boerke, A., Brewis, I.A., 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 473–480. doi:10.1387/ijdb.082583bg
- Gangwar, D., Atreja, S., 2015. Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 705–711. doi:10.1111/rda.12541
- Garner, D., Hafez, E., 1993. Spermatozoa and seminal plasma, in: *Reproduction in Farm Animals*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Gestel, R.A. van, Brewis, I.A., Ashton, P.R., Brouwers, J.F., Gadella, B.M., 2007. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Mol. Hum. Reprod.* 13, 445–454. doi:10.1093/molehr/gam030
- Guyonnet, B., Zabet-Moghaddam, M., SanFrancisco, S., Cornwall, G.A., 2012. Isolation and Proteomic Characterization of the Mouse Sperm Acrosomal Matrix. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 758–774. doi:10.1074/mcp.M112.020339
- Harayama, H., 2013. Roles of Intracellular Cyclic AMP Signal Transduction in the Capacitation and Subsequent Hyperactivation of Mouse and Boar Spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 59, 421–430. doi:10.1262/jrd.2013-056
- Harayama, H., Kato, S., 2001. Factors Regulating Changes of Head-to-Head Agglutinability in Boar Spermatozoa During Epididymal Transit and Capacitation In Vitro - Review -. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 14, 1196–1202. doi:10.5713/ajas.2001.1196
- Harayama, H., Miyake, M., Kato, S., 2000. Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and serum albumin in head-to-head agglutination of boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 12, 307–318.
- Harayama, H., Miyake, M., Shidara, O., Iwamoto, E., Kato, S., 1998. Effects of calcium and bicarbonate on head-to-head agglutination in ejaculated boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 10, 445–450.
- Harayama, H., Miyano, T., Miyake, M., Kusunoki, H., Kato, S., 1994. Identification of anti-agglutinin for spermatozoa in epididymal boar plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 436–445. doi:10.1002/mrd.1080370410
- Harayama, H., Okada, K., Miyake, M., 2003. Involvement of Cytoplasmic Free Calcium in Boar Sperm: Head-to-Head Agglutination Induced by a Cell-Permeable Cyclic Adenosine Monophosphate Analog. *J. Androl.* 24, 91–99. doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb02646.x
- Herrick, S.B., Schweissinger, D.L., Kim, S.-W., Bayan, K.R., Mann, S., Cardullo, R.A., 2005. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell. Physiol.* 202, 663–671. doi:10.1002/jcp.20172

- Ho, H.C., Suarez, S.S., 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reprod. Camb. Engl.* 122, 519–526.
- Hölzer, J., Midasch, O., Rauchfuss, K., Kraft, M., Reupert, R., Angerer, J., Kleeschulte, P., Marschall, N., Wilhelm, M., 2008. Biomonitoring of Perfluorinated Compounds in Children and Adults Exposed to Perfluorooctanoate-Contaminated Drinking Water. *Environ. Health Perspect.* 116, 651–657. doi:10.1289/ehp.11064
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., Breitbart, H., 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J. Androl.* 14, 816–821. doi:10.1038/aja.2012.81
- Ilio, K.Y., Hess, R.A., 1994. Structure and function of the ductuli efferentes: A review. *Microsc. Res. Tech.* 29, 432–467. doi:10.1002/jemt.1070290604
- Jagannathan, S., Punt, E.L., Gu, Y., Arnoult, C., Sakkas, D., Barratt, C.L.R., Publicover, S.J., 2002. Identification and Localization of T-type Voltage-operated Calcium Channel Subunits in Human Male Germ Cells EXPRESSION OF MULTIPLE ISOFORMS. *J. Biol. Chem.* 277, 8449–8456. doi:10.1074/jbc.M105345200
- Jaiswal, B.S., Conti, M., 2003. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10676–10681. doi:10.1073/pnas.1831008100
- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J.A., Garcíá, A., Betancourt, M., Fierro, R., 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59, 1171–1180.
- Joensen, U.N., Bossi, R., Leffers, H., Jensen, A.A., Skakkebæk, N.E., Jørgensen, N., 2009. Do Perfluoroalkyl Compounds Impair Human Semen Quality? *Environ. Health Perspect.* 117, 923–927. doi:10.1289/ehp.0800517
- Jones, P.D., Hu, W., De Coen, W., Newsted, J.L., Giesy, J.P., 2003. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 22, 2639–2649.
- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K.S., Loganathan, B.G., Mohd, M.A., Olivero, J., Van Wouwe, N., Yang, J.H., Aldoust, K.M., 2004. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4489–4495.
- Kennedy, G.L., Butenhoff, J.L., Olsen, G.W., O'Connor, J.C., Seacat, A.M., Perkins, R.G., Biegel, L.B., Murphy, S.R., Farrar, D.G., 2004. The toxicology of perfluorooctanoate. *Crit. Rev. Toxicol.* 34, 351–384.
- Kiselyov, K., Patterson, R.L., 2009. The integrative function of TRPC channels. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 45–58.
- Kleszczyński, K., Składanowski, A.C., 2009. Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. I. alteration in plasma membrane potential and intracellular pH level. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 300–305. doi:10.1016/j.taap.2008.10.008
- Kudo, N., Kawashima, Y., 2003. Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals. *J. Toxicol. Sci.* 28, 49–57.

- Kwon, W.-S., Rahman, M.S., Lee, J.-S., Kim, J., Yoon, S.-J., Park, Y.-J., You, Y.-A., Hwang, S., Pang, M.-G., 2014. A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa. *BMC Genomics* 15, 897. doi:10.1186/1471-2164-15-897
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., Seed, J., 2007. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 99, 366–394. doi:10.1093/toxsci/kfm128
- Lau, C., Butenhoff, J.L., Rogers, J.M., 2004. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 231–241. doi:10.1016/j.taap.2003.11.031
- Liao, C., Wang, T., Cui, L., Zhou, Q., Duan, S., Jiang, G., 2009. Changes in synaptic transmission, calcium current, and neurite growth by perfluorinated compounds are dependent on the chain length and functional group. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2099–2104.
- Liao, C.-Y., Li, X.-Y., Wu, B., Duan, S., Jiang, G.-B., 2008. Acute enhancement of synaptic transmission and chronic inhibition of synaptogenesis induced by perfluorooctane sulfonate through mediation of voltage-dependent calcium channel. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5335–5341.
- Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Libelo, E.L., 2011. Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7954–7961. doi:10.1021/es2011622
- Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Kirichok, Y., 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 471, 387–391. doi:10.1038/nature09767
- Liu, X., Jin, Y., Liu, W., Wang, F., Hao, S., 2011. Possible mechanism of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on the release of calcium ion from calcium stores in primary cultures of rat hippocampal neurons. *Toxicol. In Vitro* 25, 1294–1301. doi:10.1016/j.tiv.2011.04.016
- MacManus-Spencer, L.A., Tse, M.L., Hebert, P.C., Bischel, H.N., Luthy, R.G., 2010. Binding of Perfluorocarboxylates to Serum Albumin: A Comparison of Analytical Methods. *Anal. Chem.* 82, 974–981. doi:10.1021/ac902238u
- Maravilla-Galván, R., Fierro, R., González-Márquez, H., Gómez-Arroyo, S., Jiménez, I., Betancourt, M., 2009. Effects of atrazine and fenoxaprop-ethyl on capacitation and the acrosomal reaction in boar sperm. *Int. J. Toxicol.* 28, 24–32. doi:10.1177/1091581809333138
- Mata-Martínez, E., José, O., Torres-Rodríguez, P., Solís-López, A., Sánchez-Tusie, A.A., Sánchez-Guevara, Y., Treviño, M.B., Treviño, C.L., 2013. Measuring Intracellular Ca²⁺: Changes in Human Sperm using Four Techniques: Conventional Fluorometry, Stopped Flow Fluorometry, Flow Cytometry and Single Cell Imaging. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/50344
- Mayorga, L.S., Tomes, C.N., Belmonte, S.A., 2007. Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 59, 286–292. doi:10.1080/15216540701222872

- Michelangeli, F., Ogunbayo, O.A., Wootton, L.L., 2005. A plethora of interacting organellar Ca²⁺ stores. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell regulation* 17, 135–140. doi:10.1016/j.ceb.2005.01.005
- Miller, M.R., Mansell, S.A., Meyers, S.A., Lishko, P.V., 2015. Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species. *Cell Calcium* 58, 105–113. doi:10.1016/j.ceca.2014.10.009
- Monclus, M.A., Fornes, M.W., 2016. Sperm conjugation in mammal reproductive function: Different names for the same phenomenon? *Mol. Reprod. Dev.* n/a–n/a. doi:10.1002/mrd.22636
- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J., Clapham, D.E., 2008. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 607–613. doi:10.1387/ijdb.072554bn
- Nilius, B., Flockerzi, V. (Eds.), 2014. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels, *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 2005. Results of survey on production and use of PFOS, PFAS and PFOA, related substances and products/mixtures containing these substances.
- O'Flaherty, n.d. Redox regulation of mammalian sperm capacitation [WWW Document]. URL <http://www.ajandrology.com/article.asp?issn=1008-682X;year=2015;volume=17;issue=4;spage=583;epage=590;aualast=O%27Flaherty> (accessed 12.5.16).
- Olsen, G.W., Burris, J.M., Ehresman, D.J., Froehlich, J.W., Seacat, A.M., Butenhoff, J.L., Zobel, L.R., 2007. Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Workers. *Environ. Health Perspect.* 115, 1298–1305. doi:10.1289/ehp.10009
- O'Rand, M.G., Fisher, S.J., 1987. Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zonae. *Dev. Biol.* 119, 551–559. doi:10.1016/0012-1606(87)90058-3
- Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D., Meizel, S., 1989. Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 828–833. doi:10.1016/0006-291X(89)92508-4
- Park, J.-Y., Ahn, H.-J., Gu, J.-G., Lee, K.-H., Kim, J.-S., Kang, H.-W., Lee, J.-H., 2003. Molecular identification of Ca²⁺ channels in human sperm. *Exp. Mol. Med.* 35, 285–292. doi:10.1038/emm.2003.39
- Paul, A.G., Jones, K.C., Sweetman, A.J., 2009. A First Global Production, Emission, And Environmental Inventory For Perfluorooctane Sulfonate. *Environ. Sci. Technol.* 43, 386–392. doi:10.1021/es802216n
- Petters, R.M., 1994. Transgenic livestock as genetic models of human disease. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 643–645.
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V., 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility: Mitochondria functionality in human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 35, 109–124. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x

- Plessis, S.S.D., Agarwal, A., Halabi, J., Tvrda, E., 2015. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 509–520. doi:10.1007/s10815-014-0425-7
- Publicover, S., Harper, C.V., Barratt, C., 2007. $[Ca^{2+}]_i$ signalling in sperm--making the most of what you've got. *Nat. Cell Biol.* 9, 235–242. doi:10.1038/ncb0307-235
- Rahman, M.S., Kwon, W.-S., Pang, M.-G., Rahman, M.S., Kwon, W.-S., Pang, M.-G., 2014. Calcium Influx and Male Fertility in the Context of the Sperm Proteome: An Update, Calcium Influx and Male Fertility in the Context of the Sperm Proteome: An Update. *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* 2014, 2014, e841615. doi:10.1155/2014/841615, 10.1155/2014/841615
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., Clapham, D.E., 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603–609. doi:10.1038/35098027
- Ren, D., Xia, J., 2010. Calcium Signaling Through CatSper Channels in Mammalian Fertilization. *Physiology* 25, 165–175. doi:10.1152/physiol.00049.2009
- Ruknudin, A., Silver, I.A., 1990. Ca^{2+} uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca^{2+} uptake. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 63–68. doi:10.1002/mrd.1080260110
- Salazar, Z., Ducolomb, Y., Betancourt, M., Bonilla, E., Cortés, L., Hernández-Hernández, F., González-Márquez, H., 2007. Gene expression analysis on the early development of pig embryos exposed to malathion. *Int. J. Toxicol.* 26, 143–149. doi:10.1080/10915810701226263
- Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., Visconti, P.E., 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 245–259.
- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M.R., José, O., Treviño, C.L., Hernández-Cruz, A., Darszon, A., 2014. Acrosome reaction and Ca^{2+} imaging in single human spermatozoa: new regulatory roles of $[Ca^{2+}]_i$. *Biol. Reprod.* 91, 67. doi:10.1095/biolreprod.114.119768
- Signorelli, J., Diaz, E.S., Morales, P., 2012. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res.* 349, 765–782. doi:10.1007/s00441-012-1370-3
- Singh, A.P., Rajender, S., 2015. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod. Biomed. Online* 30, 28–38. doi:10.1016/j.rbmo.2014.09.014
- Sohlenius, A.K., Andersson, K., Bergstrand, A., Spydevold, O., De Pierre, J.W., 1994. Effects of perfluorooctanoic acid--a potent peroxisome proliferator in rat--on Morris hepatoma 7800C1 cells, a rat cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1213, 63–74.
- Sohlenius, A.K., Eriksson, A.M., Högström, C., Kimland, M., DePierre, J.W., 1993. Perfluorooctane sulfonic acid is a potent inducer of peroxisomal fatty acid beta-oxidation and other activities known to be affected by peroxisome proliferators in mouse liver. *Pharmacol. Toxicol.* 72, 90–93.

- Spungin, B., Margalit, I., Breitbart, H., 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J. Cell Sci.* 108, 2525–2535.
- Steenland, K., Jin, C., MacNeil, J., Lally, C., Ducatman, A., Vieira, V., Fletcher, T., 2009. Predictors of PFOA levels in a community surrounding a chemical plant. *Environ. Health Perspect.* 117, 1083–1088. doi:10.1289/ehp.0800294
- Suarez, S.S., Ho, H.C., 2003. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 49, 351–356.
- Sudlow, G., Birkett, D.J., Wade, D.N., 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 12, 1052–1061.
- Toft, G., Jonsson, B.A.G., Lindh, C.H., Giwercman, A., Spano, M., Heederik, D., Lenters, V., Vermeulen, R., Rylander, L., Pedersen, H.S., Ludwicki, J.K., Zvezdai, V., Bonde, J.P., 2012. Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in arctic and European populations. *Hum. Reprod.* 27, 2532–2540. doi:10.1093/humrep/des185
- Treviño, C.L., Felix, R., Castellano, L.E., Gutiérrez, C., Rodríguez, D., Pacheco, J., López-González, I., Gomora, J.C., Tsutsumi, V., Hernández-Cruz, A., Fiordelisio, T., Scaling, A.L., Darszon, A., 2004. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca²⁺ channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* 563, 87–92. doi:10.1016/S0014-5793(04)00257-1
- Tulsiani, D.R., Yoshida-Komiya, H., Araki, Y., 1997. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol. Reprod.* 57, 487–494. doi:10.1095/biolreprod57.3.487
- Upham, B.L., Deocampo, N.D., Wurl, B., Trosko, J.E., 1998. Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 78, 491–495.
- Vanden Heuvel, J.P., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) and carcinogenesis. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 47, 1–8.
- Visconti, P.E., Ning, X., Fornés, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., Kopf, G.S., 1999. Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm: Cholesterol Release Signals an Increase in Protein Tyrosine Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation. *Dev. Biol.* 214, 429–443. doi:10.1006/dbio.1999.9428
- Wang, C., Liu, Y., Cao, J.-M., 2014. G Protein-Coupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15412–15425. doi:10.3390/ijms150915412
- Ward, C.R., Storey, B.T., 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* 104, 287–296.
- Wennemuth, G., Babcock, D.F., Hille, B., 2003. Calcium Clearance Mechanisms of Mouse Sperm. *J. Gen. Physiol.* 122, 115–128. doi:10.1085/jgp.200308839
- Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U.B., Weyand, I., 1998. Cyclic Nucleotide-gated Channels on the Flagellum Control Ca²⁺ Entry into Sperm. *J. Cell Biol.* 142, 473–484. doi:10.1083/jcb.142.2.473

- Wilding, M., Dale, B., 1997. Sperm factor: what is it and what does it do? *Mol. Hum. Reprod.* 3, 269–273. doi:10.1093/molehr/3.3.269
- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization, in: *Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, NY, USA, pp. 189–317.
- Zhao, Y., Tan, Y.S., Haslam, S.Z., Yang, C., 2010. Perfluorooctanoic Acid Effects on Steroid Hormone and Growth Factor Levels Mediate Stimulation of Peripubertal Mammary Gland Development in C57Bl/6 Mice. *Toxicol. Sci.* 115, 214–224. doi:10.1093/toxsci/kfq030



Efecto del ácido
perfluorooctanoico sobre el
flujo de Ca^{2+} intracelular
durante la capacitación in vitro
de espermatozoides de cerdo
doméstico

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 27 del mes de enero del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LEONOR RODRIGUEZ CRUZ
M. EN C. ANA LILIA ROA ESPITIA
DR. JOSE FERNANDO LAZCANO PEREZ
DRA. MARIA MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS

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

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL
DE: GUADALUPE HERNANDEZ OJEDA



GUADALUPE HERNANDEZ OJEDA
ALUMNA

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

APROBAR

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. LEONOR RODRIGUEZ CRUZ

VOCAL

Ana Lilia Roa

M. EN C. ANA LILIA ROA ESPITIA

VOCAL

DR. JOSE FERNANDO LAZCANO PEREZ

SECRETARIA

DRA. MARIA MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS