



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Posgrado en Ciencias Biológicas y de la Salud

**“Efecto de la exposición de espermatozoides de cerdo a los  
perfluorados sulfonato de perfluorohexano (PFHxS) y  
sulfonato de perfluorooctano (PFOS)”**

**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas y de la salud

**PRESENTA:**

M. en B. E. Iván Oseguera López

2163802455

orcid:0000-0002-3547-3751

ivanoslo@yahoo.com.mx

**Director:**

Dr. Humberto González Márquez.

**Jurado:**

Presidente: Dr. Humberto González Márquez

Secretaria: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Vocal: Dra. Sonia Heras García

Vocal: Dra. Irma Jiménez Morales

Vocal: Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Iztapalapa, Ciudad de México, 24 de agosto de 2021

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

---

El presente trabajo fue realizado en:

- El laboratorio de Expresión Génica y el de Andrología del Departamento de Ciencias de la Salud de la DCBS, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), México, bajo la dirección del Dr. Humberto González Márquez y la asesoría de las Dras. Reyna Carmen Fierro Pastrana e Irma Jiménez Morales.
- El Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Madrid, España, bajo la asesoría del Dr. Serafín Pérez Cerezales

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 283833 y CVU 482554, que comprendió del periodo del 01 de septiembre de 2016 hasta el 31 de agosto de 2020.

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT con número de registro 001480, además cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-

## **JURADO**

---

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó, la Tesis titulada:

**“Efecto de la exposición de espermatozoides de cerdo a los perfluorados sulfonato de perfluorohexano (PFHxS) y sulfonato de perfluorooctano (PFOS)”**

que presentó

**M en B.E. Iván Oseguera López**

El día 24 de agosto del año 2021

**Jurado:**



**Dr. Humberto González Márquez**

**Presidente**



**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**

**Secretaria**



**Dra. Sonia Heras García**

**Vocal**



**Dra. Irma Jiménez Morales**

**Vocal**



**Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño**

**Vocal**

## COMITÉ TUTORAL

---

Director

Dr. Humberto González Márquez

Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

[hgm@xanum.uam.mx](mailto:hgm@xanum.uam.mx)

Asesora

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

[reyna@xanum.uam.mx](mailto:reyna@xanum.uam.mx)

Asesora

Dra. Irma Jiménez Morales.

Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.mx)

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Dr. Humberto González Márquez, por apoyarme durante toda mi formación académica desde licenciatura hasta este punto, por estar siempre al pendiente y apoyarme en todo lo posible. Doc. siempre será un gusto trabajar con usted.

A la Dra. Reyna Fierro Pastrana, que a pesar de no conocerme anteriormente me invito a participar en este proyecto, muchas gracias por estar siempre al pendiente de mí y por todo el apoyo incondicional que me brinda.

A la Dra. Irma Jiménez Morales, por todo su apoyo, por ayudarme a conocer esta línea de investigación, y por todos los comentarios para mejorar este trabajo.

A la Dra. Sonia Heras García, por ayudarme en la revisión y mejora de este trabajo. Sonia te agradezco por brindarme tu amistad, por orientarme y apoyarme siempre. Gracias por confiar en mí.

A la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño, por los comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

Al Dr. Alfonso Gutiérrez Adán, por la ayuda brinda para poder realizar mi estancia de investigación en el INIA.

Al Sindicato Nacional de trabajadores de la CONADE, especialmente a su secretario general el C. Santiago León. Por toda la ayuda y el apoyo brindado para la culminación de este proyecto. Hermano, siempre te estaré agradecido.

A la CONADE, bajo la dirección de la Lic. Ana Gabriela Guevara Espinoza. Les agradezco por toda la ayuda brindada durante mi estancia de investigación y por la ayuda para la impresión de la presente tesis.

A Erick, por siempre estar al pendiente de mí y apoyarme en todo, gracias pollo.

A mis amigos de UAM, Leslye gracias por escucharme, apoyarme y estar presente en todo momento. A Paola por ayudarme y estar siempre presente. Óscar por todas las tardes de café, platica y cenas improvisadas. A todos muchas gracias por su ayuda.

Berenice y Joaquín, gracias por todos los buenos momentos que compartimos, por cumplirme el sueño de ver jugar al Atleti en casa, y sobre todo por su amistad.

A todos mis compañeros del INIA por los buenos momentos y las noches de cañas. Benja, Sonia, David, Dani, Priscila, Ricardo, Isa, Sara, Sol, Ana, a todos gracias por hacerme sentir como en casa.

A mis amigos que me apoyan en todo momento y que cuento con ellos incondicionalmente: Citlallin Almaguer, Claudia Gonzaga, Sinuhé Cedillo.

Al Dr. Raúl Sánchez Sánchez y al Dr. Ernesto Gómez Fidalgo por la ayuda para la obtención de las muestras espermáticas.

A los miembros del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la salud. Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez, por el apoyo y las ayudas brindadas. Al Lic. Vicente Cuauhtonal Gallegos Meza, por la ayuda para los tramites y por estar al pendiente de nosotros los alumnos. A la Lic. Patricia Cruz Martínez, por la ayuda que nos brinda a todos los alumnos.

## DEDICATORIAS

---

A mi mamá Elizabeth, por enseñarme el buen camino, por apoyarme y estar al pendiente de mí en todo momento. Mamá, sé que me cuidas día y noche desde el cielo, te extraño mucho.

A mi papá Alfonso, gracias por ayudarme, escucharme y apoyarme en todo momento.

A mi amigo Serafín, gracias por confiar en mí y apoyarme siempre, por todos los conocimientos que me compartiste, y sobre todo gracias por tu amistad. Te adelantaste en este camino, pero sé que en algún momento nos volveremos a encontrar.

## RESUMEN

---

En la actualidad, la infertilidad asociada a factores masculinos conforma aproximadamente un 50% de los casos reportados, siendo una de las principales causas el factor químico, como son la exposición a diversos medicamentos, pesticidas, tóxicos ambientales y sustancias de uso recreativo.

Dentro de la categoría de factores químicos, se encuentran los compuestos perfluorados, que son químicos tóxicos, sintéticos, de difícil degradación y bio-acumulativos. A pesar de estar catalogados como “Químicos orgánicos persistentes” por la Convención de Estocolmo, estos compuestos se siguen produciendo masivamente y son empleados en productos de uso cotidiano. Algunos de estos compuestos ya han sido evaluados en diversos organismos y líneas celulares con la finalidad de conocer los efectos negativos asociados con su uso, no obstante, su efecto sobre los procesos fisiológicos de los espermatozoides antes de la fertilización no ha sido descrito. Debido a lo anterior, este trabajo se centró en analizar los efectos tóxicos y las alteraciones fisiológicas causadas por los compuestos sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y sulfonato de perfluorohexano (PFHxS), en los espermatozoides de cerdo durante el proceso de capacitación *in vitro*.

La capacitación espermática se realizó en medio TALP-HEPES, suplementado con piruvato y BSA. Los valores para la concentración letal media fueron de 460.55  $\mu\text{M}$  para PFOS y 1930.60  $\mu\text{M}$  para PFHxS. Los resultados obtenidos por medio de la tinción con clortetraciclina, evidenciaron que PFOS ocasiona una alteración en los patrones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular unido a proteínas de membrana. El empleo de la técnica FITC-PNA permitió establecer que la reacción acrosomal espontánea se ve limitada por PFOS, mientras que

con la presencia de PFHxS se observó un aumento. El análisis por citometría de flujo, mostró que ambos compuestos aumentaron la producción de especies reactivas de oxígeno a partir de los 30 minutos de exposición. Adicionalmente, la exposición incrementó la fragmentación de ADN de manera significativa, de acuerdo a los resultados obtenidos con las pruebas de ensayo cometa. Finalmente, las imágenes adquiridas por la técnica de inmunocitoquímica, exhibieron una alteración en la fosforilación de proteínas en la zona ecuatorial y acrosomal de la cabeza del espermatozoide por parte de ambos compuestos.

De manera concluyente, se puede establecer que ambos compuestos analizados en este estudio, tienen un efecto tóxico en los espermatozoides, causando mortalidad y alteración en diversos parámetros que resultan vitales para que el espermatozoide pueda cumplir sus funciones fisiológicas de forma apropiada.

## ABSTRACT

---

Currently, infertility associated with male factors constitutes approximately 50% of reported cases, being the chemical factor one of the main causes, such as the exposure to various drugs, pesticides, environmental toxics and recreational substances. There are perfluorinated compounds within the category of chemical factors, which are toxic, synthetic, difficult to break down, and bio-accumulative chemicals. Despite being classified as “Persistent Organic Chemicals” by the Stockholm Convention, these compounds are still mass-produced and used in everyday products.

Some of these compounds have already been evaluated in various organisms and cell lines in order to know the adverse effects associated with their use. However, their effect on the physiological processes of sperm that take place before fertilization has not been described. Therefore, this work focused on analyzing the toxic effects and physiological alterations caused by the perfluorinated compounds, perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorohexane sulfonate (PFHxS) in boar sperm during the *in vitro* capacitation.

Sperm capacitation was performed in TALP-HEPES medium, supplemented with pyruvate and BSA. The values for the median lethal concentration were 460.55  $\mu\text{M}$  for PFOS and 1930.60  $\mu\text{M}$  for PFHxS. The results obtained by staining with chlortetracycline showed that PFOS caused an alteration in the patterns of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  bound to membrane proteins. The FITC-PNA technique allowed us to establish that the spontaneous acrosomal reaction was limited by PFOS, while an increment was observed by the presence of PFHxS. Flow cytometry analysis showed that both compounds increased the production of reactive oxygen species after 30 minutes of exposure.

Additionally, the exposure to both compounds significantly increased DNA fragmentation, according to the results obtained with the comet assay tests. Finally, the images acquired using immunocytochemistry, showed an alteration in the protein phosphorylation in the equatorial and acrosomal zone of the sperm head by both compounds. In conclusion, it can be established that both compounds analyzed in this study have a toxic effect on sperm, causing mortality and alteration in various parameters that are vital for the sperm to be able to perform its physiological functions properly.

## ABREVIATURAS

---

**ANOVA:** Análisis de varianza

**BSA:** Albúmina sérica de bovino

**cAMP:** Adenosín monofosfato cíclico

**CL<sub>50</sub>:** Concentración letal 50

**COP** Contaminantes orgánicos  
persistentes

**CTC:** Clorotetraciclina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**FI:** Intensidad de fluorescencia

**FITC-PNA:** Isotiocianato de fluoresceína  
conjugado con aglutinina de cacahuete

**H2DCFDA:** 2',7'-diacetato de  
diclorodihidrofluoresceína

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**IB:** Tampón de incubación

**MDC:** Medio de capacitación

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBS:** Solución salina de fosfatos

**PFCs:** Compuestos perfluorados

**PFHxS:** Sulfonato de perfluorohexano

**PFOS:** Sulfonato de perfluorooctano

**PI:** Ioduro de propidio

**PKC:** Proteína cinasa C

**POPRC-14:** Decimocuarta reunión del  
Comité de Examen de Contaminantes  
Orgánicos Persistentes

**RA:** Reacción acrosomal

**RAe** Reacción acrosomal espontánea

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SCGE:** Electroforesis de células  
individuales

# ÍNDICE GENERAL

---

|                                                                                                  |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMEN</b> .....                                                                             | <b>I</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                                            | <b>III</b>  |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....                                                                        | <b>V</b>    |
| <b>ÍNDICE GENERAL</b> .....                                                                      | <b>VI</b>   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....                                                                   | <b>IX</b>   |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....                                                                    | <b>XIII</b> |
| <b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....                                                                      | <b>1</b>    |
| 1.1 INFERTILIDAD .....                                                                           | 2           |
| 1.2 ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFERO .....                                                            | 3           |
| 1.3 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y REACCIÓN ACROSOMAL (RA) .....                                     | 5           |
| 1.4 RELACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS) CON LA CAPACITACIÓN<br>ESPERMÁTICA ..... | 9           |
| 1.5 XENOBIÓTICOS .....                                                                           | 11          |
| 1.6 COMPUESTOS PERFLUORADOS (PFCs) .....                                                         | 12          |
| 1.6.1 Sulfonato de Perfluorohexano (PFHxS) .....                                                 | 13          |
| 1.6.2 Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS).....                                                   | 15          |
| 1.7 EFECTOS DE LOS PFCs EN HUMANOS .....                                                         | 16          |
| 1.8 TOXICOLOGÍA REPRODUCTIVA.....                                                                | 17          |
| 1.9 USO DE MODELOS ANIMALES EN ESTUDIOS BIOLÓGICOS .....                                         | 18          |
| 1.9.1 El cerdo como modelo de estudio biológico .....                                            | 19          |
| <b>2 ANTECEDENTES</b> .....                                                                      | <b>20</b>   |
| <b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....                                                                     | <b>23</b>   |

|          |                                                                                                                             |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4</b> | <b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>                                                                                      | <b>24</b> |
| <b>5</b> | <b>HIPÓTESIS.....</b>                                                                                                       | <b>24</b> |
| <b>6</b> | <b>OBJETIVO GENERAL .....</b>                                                                                               | <b>25</b> |
| <b>7</b> | <b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>                                                                                          | <b>25</b> |
| <b>8</b> | <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>                                                                                           | <b>26</b> |
| 8.1      | OBTENCIÓN DE MUESTRA ESPERMÁTICA, CONDICIONES DE CAPACITACIÓN <i>IN VITRO</i> Y TRATAMIENTO CON LOS PFCs .....              | 26        |
| 8.2      | DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA ( $CL_{50}$ ) DURANTE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....                        | 27        |
| 8.3      | VIABILIDAD ESPERMÁTICA.....                                                                                                 | 27        |
| 8.4      | CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL ESPONTÁNEA (RAE) .....                                                                    | 29        |
| 8.5      | ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ROS DURANTE LA CAPACITACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ESPERMATOZOIDES EXPUESTOS A PFCs.....           | 32        |
| 8.6      | ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS PFCs SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA.....                            | 32        |
| 8.7      | CITOMETRÍA DE FLUJO.....                                                                                                    | 35        |
| 8.8      | ELECTROFORESIS DE CÉLULAS INDIVIDUALES O ENSAYO COMETA (SCGE) .....                                                         | 35        |
| 8.9      | ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....                                                                                                 | 36        |
| <b>9</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                                     | <b>37</b> |
| 9.1      | DETERMINACIÓN DE LA $CL_{50}$ .....                                                                                         | 37        |
| 9.2..... | VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES EN CONCENTRACIONES DE $\frac{1}{5} CL_{50}$ , $\frac{1}{2} CL_{50}$ Y $CL_{50}$ DE PFCs ..... | 38        |
| 9.3      | EFECTO DE LOS PFCs EN EL PROCESO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA .....                                                          | 39        |
| 9.4      | EFECTO DE LOS PFCs SOBRE EL PROCESO DE RA .....                                                                             | 40        |
| 9.4.1    | Efecto del PFCs sobre el proceso de RAe .....                                                                               | 40        |

|           |                                                                                    |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 9.4.2     | Efecto de PFOS sobre el proceso de RA inducida .....                               | 42        |
| 9.5       | EFFECTO DE LOS PFCS SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA... | 43        |
| 9.5.1     | Citometría de flujo.....                                                           | 43        |
| 9.5.2     | Microscopia de fluorescencia .....                                                 | 44        |
| 9.6       | CUANTIFICACIÓN DE ROS.....                                                         | 45        |
| 9.7       | CUANTIFICACIÓN DE DAÑO AL ADN DE ESPERMATOZOIDES.....                              | 46        |
| <b>10</b> | <b>DISCUSIÓN.....</b>                                                              | <b>48</b> |
| <b>11</b> | <b>CONCLUSIONES .....</b>                                                          | <b>56</b> |
| 11.1      | PFOS .....                                                                         | 56        |
| 11.2      | PFHxS .....                                                                        | 56        |
| <b>12</b> | <b>PERSPECTIVAS .....</b>                                                          | <b>58</b> |
| <b>13</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                                           | <b>59</b> |
| <b>14</b> | <b>ANEXO.....</b>                                                                  | <b>75</b> |
| <b>15</b> | <b>PRODUCTOS DERIVADOS DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.....</b>                      | <b>77</b> |
| 15.1      | ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN.....                                                    | 77        |
| 15.2      | ARTÍCULO DE REVISIÓN .....                                                         | 79        |
| 15.3      | CONGRESOS.....                                                                     | 80        |

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Morfología del espermatozoide tomada de (Hidalgo Ordóñez <i>et al.</i> , 2005).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 4  |
| Figura 2. Imagen ilustrativa de la diferencia de forma y tamaño de la cabeza y flagelo del espermatozoide de diferentes mamíferos y de una ave (Imagen tomada y editada de (Garner y Hafez, 2000). ....                                                                                                                                                                                                                                                          | 5  |
| Figura 3. Modelo de los eventos moleculares ocurridos durante la capacitación, reconocimiento entre gametos y reacción acrosomal (tomado de: Olivera <i>et al.</i> , 2006). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 8  |
| Figura 4. Prueba de viabilidad por la tinción de Eosina-Nigrosina. A) Campo completo de una preparación de viabilidad por esta tinción. B y C) Espermatozoides muertos teñidos en rosa por el paso de la Eosina a través de la membrana. D y E) Espermatozoides vivos, al no tener daño en la membrana permanecen en color blanco.....                                                                                                                           | 28 |
| Figura 5. Imagen representativa de la tinción de yoduro de propidio-Hoechst. A) El Hoechst penetra tanto en espermatozoides vivos como muertos otorgando una tinción azul. B) La tinción de Yoduro de propidio sólo entra en espermatozoides muertos y produce una coloración roja. C) La fusión de imágenes permite ver el espermatozoide con la membrana comprometida, marcado por la flecha. Imagen ilustrativa tomada de (Diercks <i>et al.</i> , 2012)..... | 29 |
| Figura 6. Patrones de fluorescencia obtenidos por la técnica de CTC. A) Patrón No capacitados, se observa fluorescencia tenue en toda la cabeza del espermatozoide. B) Patrón Capacitados, fluorescencia intensa en la zona ecuatorial y acrosomal de la                                                                                                                                                                                                         |    |

cabeza. C) Espermatozoides con reacción acrosomal, fluorescencia en la zona ecuatorial y en algunas ocasiones en la zona post ecuatorial. .... 30

Figura 7. Imagen representativa de la técnica FITC-PNA. Las siglas IA indican un espermatozoide con el acrosoma intacto, mientras que las siglas AE son para un espermatozoide reaccionado. Imagen tomada de (Ruiz-Díaz *et al.*, 2020). .... 31

Figura 8. Micrografías de los patrones de fluorescencia en la fosforilación de residuos de tirosina en espermatozoides de cerdo durante el proceso de capacitación *in vitro*. Se encontraron seis patrones diferentes, A) Sin fluorescencia. B) Fluorescencia en flagelo. C) Fluorescencia en segmento ecuatorial. D) Fluorescencia en segmento ecuatorial y flagelo. E) Fluorescencia en acrosoma y flagelo. (F) Fluorescencia en acrosoma, segmento ecuatorial y flagelo. Los patrones previos se clasificaron en: sin fluorescencia en la cabeza (NFH) A+B, fluorescencia en el acrosoma (AF) E, fluorescencia en el segmento ecuatorial (EF) C+D y fluorescencia en el acrosoma y en el segmento ecuatorial (AE) F. —, 1  $\mu$ m. .... 34

Figura 9. Efecto de (A) PFOS y (B) PFHxS sobre la viabilidad espermática. Se observó que el número de espermatozoides muertos aumenta al adicionar concentraciones crecientes del compuesto perfluorado. El análisis estadístico, mostró que entre los grupos control no hay diferencia significativa, sin embargo, entre las diferentes concentraciones de PFOS si existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). .... 38

Figura 10. Efecto *in vitro* de  $1/5$  CL<sub>50</sub>,  $1/2$  CL<sub>50</sub> y CL<sub>50</sub> de los PFCs sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo. No se observó diferencia significativa entre las muestras control, pero sí se observa diferencia significativa entre tratamientos y entre tratamientos y control ( $p > 0.05$ ). .... 39

Figura 11. Efecto de la exposición a PFOS sobre el proceso de capacitación de los espermatozoides de cerdo. No se observaron diferencias significativas entre las muestras control, pero si se observa diferencia significativa entre los tratamientos y entre los tratamientos y control ( $p>0.05$ ). ..... 40

Figura 12. Efecto de los PFCs sobre la reacción acrosomal espontánea (RAe) ( $n = 6$ ). Los resultados mostrados en los paneles (A) y (B), fueron determinados por la técnica CTC; mientras que los paneles (C) y (D), por FITC-PNA. (A) La exposición frente a PFOS presenta una tendencia a disminuir la RAe, no siendo significativa en ninguna de las concentraciones evaluadas. (B) La exposición a PFHxS no afecta la RAe en ninguna de las concentraciones analizadas. (C) PFOS muestra una disminución significativa en la RAe al usar desde  $\frac{1}{2}$  CL<sub>50</sub>, mientras que con  $\frac{1}{5}$  CL<sub>50</sub> no difiere significativamente del control. (D) PFHxS, aumenta significativamente la reacción del acrosoma en todas las condiciones probadas, no hubo diferencia significativa entre los controles. <sup>a, b</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). ..... 41

Figura 13. Determinación de intensidad de fluorescencia en fosforilación de proteínas por citometría de flujo. Se obtuvo diferencia significativa entre los espermatozoides sin capacitar a T0 y todas las condiciones de capacitación utilizadas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las condiciones de capacitación probadas. La intensidad de fluorescencia fue determinada como unidades arbitrarias (AU). <sup>a, b</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). ..... 43

Figura 14. Producción de ROS en espermatozoides durante el proceso de capacitación. Se observa un aumento significativo en ROS a los 30 minutos de exposición frente a ambos compuestos PFCs. A las 2 horas, el aumento de ROS provocado por el tratamiento con PFOS ya no es significativo comparado con el control. <sup>a, b</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en el mismo tiempo de incubación. <sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas con el mismo tratamiento a diferente tiempo de incubación. ( $p < 0.05$ ). ..... 46

Figura 15. Proporción de espermatozoides con DNA fragmentado determinado por ensayo cometa. Se observa que la fragmentación de ADN incrementa tras la exposición a ambos PFCs. La mayor fragmentación se presenta con la exposición a PFHxS. En las micrografías, A) se observa una muestra sin fragmentación de ADN, B) Muestra con fragmentación media de ADN, correspondiente a la exposición de PFOS, C) Muestra con alta fragmentación, correspondiente a la exposición de PFHxS. <sup>a, b, c</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). ..... 47

Figura 16. Micrografía electrónica en aumento 40X que muestra el perfil de aglutinación observado en los espermatozoides sometidos a las diferentes concentraciones de PFOS; destacándose la motilidad no progresiva bajo la mayor concentración de PFOS. .... 76

Figura 17. Micrografía electrónica en aumento 40X que muestra el perfil de aglutinación observado en los espermatozoides sometidos a las fracciones y a la concentración letal media de PFOS. .... 76

## ÍNDICE DE TABLAS

---

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de PFHxS .....                                                                    | 15 |
| Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de PFOS.....                                                                      | 16 |
| Tabla 3. Efecto <i>in vitro</i> de PFOS sobre el proceso de reacción acrosomal inducida de espermatozoides de cerdo. .... | 42 |
| Tabla 4. Efecto de los PFCs en los patrones de fosforilación de residuos de tirosina en espermatozoides de cerdo. ....    | 45 |
| Tabla 5. Efecto de los PFOS sobre la motilidad y aglutinación <i>in vivo</i> de espermatozoides de cerdo.....             | 75 |

# 1 INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema de salud definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la imposibilidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares y sin protección, debido a un deterioro de la capacidad de una persona para reproducirse como individuo o con su pareja (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Entre 15 y 20% de las parejas en edad reproductiva son infértiles y, de éstas, en más del 50% es debida a factores masculinos (Katz *et al.*, 2017, Oseguera-Lopez *et al.*, 2019). Existen varios factores que pueden causar infertilidad masculina. Se ha demostrado que los químicos contaminantes están involucrados en la disminución de la capacidad fecundante masculina (Selvaraju *et al.*, 2021, Chiang *et al.*, 2017).

La producción de compuestos químicos se ha duplicado dentro del período comprendido entre los años 2000-2017, con una manufactura de 2.3 billones de toneladas que conlleva una derrama económica de unos 3.47 trillones de dólares solamente en el año 2017 (United Nations Environment Programme, 2019). En el caso de los compuestos perfluorados (PFCs), entre 1970 y 2002, la producción de fluoruro de perfluorooctanosulfonilo (precursor del PFOS) fue superior a las 100,000 toneladas (Paul *et al.*, 2009), y se estima que alrededor de 45,000 toneladas contaminaron el aire y el agua (Shi *et al.*, 2012). La inquietud creciente a nivel mundial por el impacto de los PFCs de cadena larga en el ambiente y en la salud, ocasionó que el productor principal, la Compañía 3M, disminuyera gradualmente la producción de ácido perfluorooctanoico (PFOA) y PFOS en el año 2000, dando paso al establecimiento de iniciativas reguladoras para reducir la liberación ambiental de estos compuestos en muchos países (Lee, 2018).

## 1.1 Infertilidad

Existen causas muy diversas por las que una pareja puede ser infértil; para lograr un embarazo es necesario que los procesos fisiológicos de la reproducción se realicen correctamente, entre ellos tenemos la gametogénesis y la maduración de células sexuales. Las causas de la infertilidad pueden ser masculinas, femeninas o mixtas, en varios estudios se estima que el factor masculino es la causa del 50% de los casos de infertilidad de pareja; de éste, el 30% es causado sólo por el factor masculino y el 20% restante es una conjunción del factor masculino y femenino (Katz *et al.*, 2017, Agarwal *et al.*, 2015).

Algunas condiciones que pueden ocasionar la infertilidad masculina son:

- Eyaculación precoz, problemas estructurales o lesiones en los órganos reproductores.
- Fisiología espermática anormal o producción espermática pobre. Algunas enfermedades tales como el varicocele, diabetes, infecciones sexuales como clamidia o gonorrea, defectos genéticos etc., pueden estar relacionadas con daños espermáticos y baja producción. Por su parte, el cáncer y los tratamientos como quimioterapia o radioterapia también pueden dañar severamente la producción espermática.
- Exposición a factores químicos o ambientales, entre los que destacan medicamentos, pesticidas, tóxicos ambientales, sustancias de uso recreativo (alcohol, tabaco, marihuana, etc.), temperaturas elevadas, radiación, entre otras.

## 1.2 Espermatozoides de mamífero

El mecanismo de fecundación de los mamíferos es bien conocido, presentan gametos haploides y la fecundación es interna. De manera general, los espermatozoides de los mamíferos comparten una estructura semejante (Fig. 1), presentan:

- Una cabeza que contiene el núcleo y en su interior la cromatina muy condensada, causada por el cambio de histonas por protaminas durante la espermiogénesis (Cambiasso *et al.*, 2018); el acrosoma, que es un saco membranoso que contiene enzimas hidrolíticas y, además, la cabeza contiene cantidades pequeñas de citoesqueleto y citoplasma.
- Una pieza intermedia rica en mitocondrias donde se genera la energía necesaria para la motilidad espermática.
- Un flagelo único, necesario para su desplazamiento.

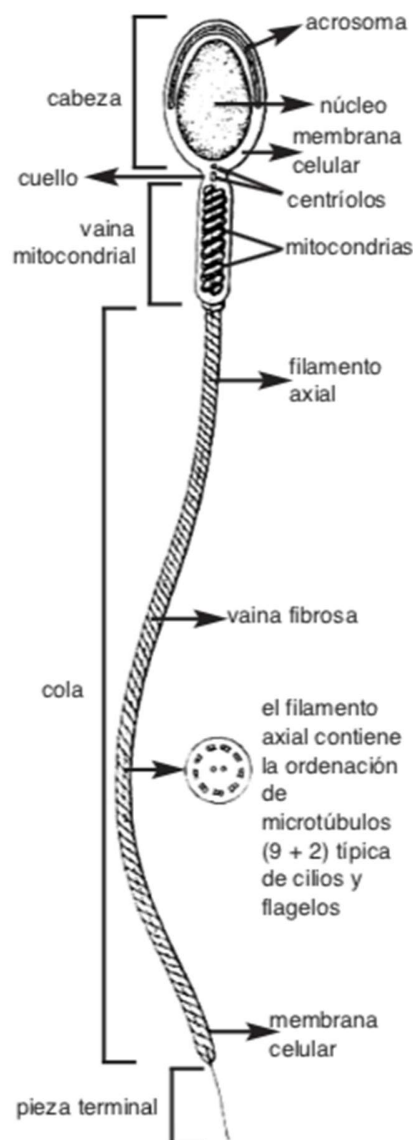


Figura 1. Morfología del espermatozoide tomada de (Hidalgo Ordóñez *et al.*, 2005).

Sin embargo, las diferencias principales entre los espermatozoides de los mamíferos radican en el tamaño y forma de la cabeza, y la longitud del flagelo que está directamente relacionada con la velocidad de propulsión (Fig. 2) (Thompson *et al.*, 2018).

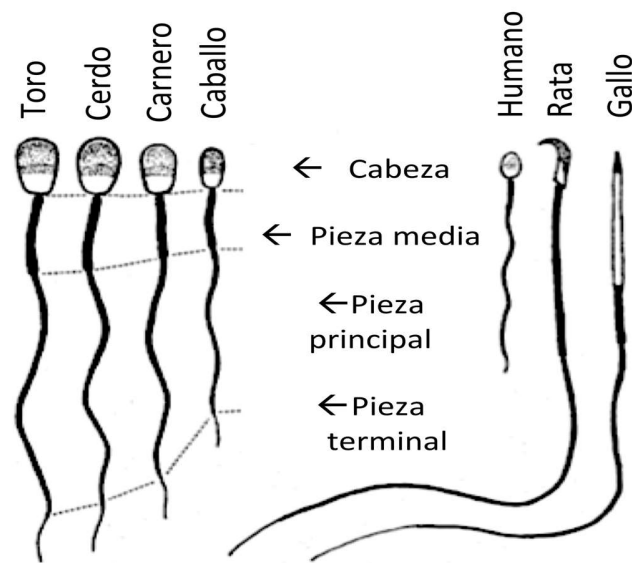


Figura 2. Imagen ilustrativa de la diferencia de forma y tamaño de la cabeza y flagelo del espermatozoide de diferentes mamíferos y de una ave (Imagen tomada y editada de (Garner y Hafez, 2000).

Los espermatozoides se producen en los túbulos seminíferos de los testículos y son transportados a través del epidídimo, en donde ocurre el proceso de maduración. Entre los cambios que se producen en el epidídimo están la adquisición del potencial para la motilidad sostenida, la pérdida de agua y la migración distal, así como la pérdida eventual de la gota citoplasmática (Hafez, 2002).

### 1.3 Capacitación espermática y reacción acrosomal (RA)

La capacitación espermática es una serie de cambios de señalización, bioquímicos y de remodelación estructural que permite al espermatozoide adquirir la capacidad fecundante (Roldan, 2018, Yanagimachi, 1994), este proceso se produce en el tracto reproductor de la hembra (Cole y Kramer, 2016, Hafez, 2002). Se ha demostrado que estos cambios están

relacionados con modificaciones en la superficie del espermatozoide, hiperactivación de la motilidad y cambios necesarios para la interacción con el ovocito (Sutovsky, 2018).

En la capacitación espermática, la activación de la adenilciclase dependiente de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y de la proteína cinasa A, permiten la fosforilación de tirosinas de un grupo de proteínas (flagelares y de otros sitios de la membrana) regulada por el adenil monofosfato cíclico (cAMP). En células somáticas, la mayoría de las fosforilaciones ocurren en residuos de serina y treonina de las proteínas y, en menor grado, en residuos de tirosina; en los espermatozoides de mamíferos se ha encontrado que la fosforilación de los residuos de tirosina resulta muy importante en la capacitación espermática (Tardif *et al.*, 2001, Naz y Rajesh, 2004).

Durante la capacitación, también se presenta una serie de modificaciones en la membrana plasmática tales como: 1) la pérdida de colesterol que precede a la cascada de fosforilación de tirosinas (Visconti *et al.*, 1999), 2) la pérdida de la asimetría de los lípidos (Flesch *et al.*, 2001), 3) la hiperpolarización (Zeng *et al.*, 1995), 4) la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Florman *et al.*, 1998), y 5) la pérdida y redistribución de glicoproteínas de la membrana plasmática (Jimenez *et al.*, 2006). La pérdida de los factores descapacitantes y la adquisición de hipermotilidad por parte del espermatozoide son también cambios morfológicos y fisiológicos que se ven afectados durante la capacitación espermática (Suarez y Ho, 2003).

Tanto los espermatozoides de la cola del epidídimo como los eyaculados pueden capacitarse *in vitro*, al ser incubados en medios definidos que simulan la composición de los electrolitos de los fluidos del tracto reproductor de la hembra (Yanagimachi, 1994). Anteriormente se pensaba que la RA sólo era inducida por la unión del espermatozoide con

la zona pelúcida, específicamente con la glicoproteína ZP3. Pero actualmente existen estudios que demuestran que diversos factores también pueden provocar la RA, algunos ejemplos son: fluido folicular, progesterona, ionóforos de calcio como la ionomicina y el A23187 (Vazquez-Levin y Verón, 2018). Fisiológicamente, la RA consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa (Fig. 3). Se produce una vesiculación sobre el segmento anterior del acrosoma, lo que da lugar a la liberación de enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina, las cuales ayudan al espermatozoide durante su paso por la zona pelúcida y le permiten su unión al oolema (Hafez, 2002). Existen varios factores que hacen posible la RA, entre ellos se encuentran 1) el incremento del pH intracelular, 2) la despolarización de la membrana plasmática, y 3) el aumento de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , que activan tanto a la fosfolipasa C como a la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , los que, a su vez, activan a la proteína cinasa C (PKC) mediante la formación de diacilglicerol, ácidos grasos libres y lisofosfatidilcolina (Flesch y Gadella, 2000). Todos estos cambios estructurales y bioquímicos tienen lugar en la membrana plasmática.

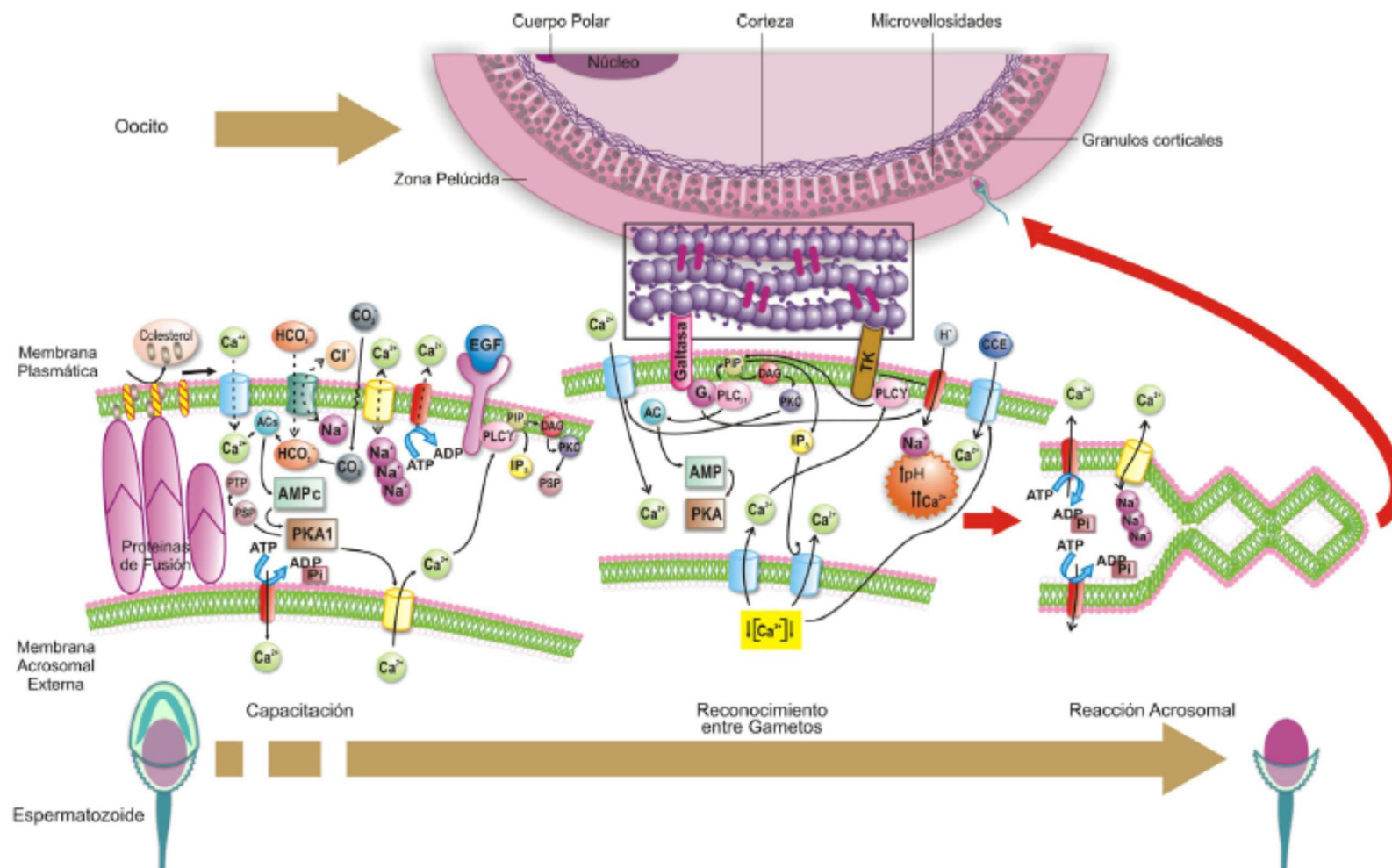


Figura 3. Modelo de los eventos moleculares ocurridos durante la capacitación, reconocimiento entre gametos y reacción acrosomal (tomado de: Olivera *et al.*, 2006).

## **1.4 Relación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) con la capacitación espermática**

Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado (Arenas-Ríos *et al.*, 2014), entre éstos se encuentran las especies reactivas de oxígeno, conocidas como ROS por sus siglas en inglés (Reactive Oxygen Species). Las fuentes principales de ROS en el espermatozoide son la mitocondria y la enzima NADPH oxidasa. Sin embargo, esta última sólo está presente en espermatozoides testiculares, disminuyendo progresivamente conforme avanza la maduración espermática en el epidídimo, razón por la cual la fuente principal de ROS en espermatozoides maduros es la mitocondria (Aitken *et al.*, 2012). La producción de ROS ha sido relacionada con la fosforilación de tirosinas y con la capacitación espermática (Guthrie y Welch, 2012). Se han reportado los efectos positivos que ejercen las ROS durante la capacitación en diversas especies, ya que su presencia se ha asociado con un aumento en la fosforilación de tirosina, estimulando directamente a la adenilciclase y a la tirosina cinasa e inhibiendo a la tirosina fosfatasa (Ford, 2004). Sin embargo, cuando la producción de ROS excede la capacidad defensiva antioxidante del espermatozoide, provoca el proceso denominado estrés oxidante (Guthrie y Welch, 2012). El sistema de defensa antioxidante contra las ROS son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) (Quiroz y Bahena, 2008).

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), puede también incrementar la fosforilación de la tirosina al inhibir a la enzima tirosina fosfatasa. Esta última contiene un residuo de cisteína que debe permanecer en un estado reducido para tener actividad, sin embargo, en presencia del  $H_2O_2$  se oxida y pierde actividad (Awda *et al.*, 2009).

Como ha sido mencionado, las ROS son de suma importancia en los procesos fisiológicos que son necesarios para que el espermatozoide adquiera su capacidad fecundante, pero ante niveles elevados de estas especies se han observado efectos nocivos que pueden estar relacionados con la infertilidad masculina. Algunos efectos adversos en el espermatozoide, asociados con los niveles elevados de ROS y que están plenamente documentados son:

- Peroxidación lipídica. Debido a los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados contenidos en su membrana plasmática, el espermatozoide es susceptible a la peroxidación lipídica. Esto ocurre cuando los electrones de los lípidos son sustraídos por las ROS, y una cadena de reacciones redox genera aldehídos electrofílicos muy mutagénicos y genotóxicos tales como malondialdehído, 4-hidroxinonenal y acroleína (Agarwal *et al.*, 2003, Luczaj y Skrzydlewska, 2003).
- Daño en el ADN: Dentro del espermatozoide, las ROS dañan la mitocondria, destruyendo el ADN mitocondrial e inhibiendo la producción de ATP. Ante la falta de ATP intracelular, la función y motilidad espermática se ven afectadas (Agarwal *et al.*, 2014). Los niveles elevados de ROS, también producen daños a nivel nuclear, causan alteraciones en las bases, rupturas en las cadenas y están involucradas en el entrecruzamiento de la cromatina. La cromatina del espermatozoide, al estar muy condensada y organizada, coadyuva en la protección al daño oxidante, pero si la compactación es deficiente o la protaminación está incompleta, el ADN se vuelve vulnerable a los daños generados por las ROS (Iommiello *et al.*, 2015).
- Daño en las proteínas: Las ROS median algunas modificaciones post-traduccionales en las proteínas para el control de funciones celulares. A pesar de ello, en presencia

de niveles elevados de ROS, se pueden generar modificaciones difíciles de revertir, por ejemplo, la sulfonación. Adicionalmente, se encuentra relacionada con la inactivación de enzimas como la succinato deshidrogenasa, el aumento de la S-nitrosilación y la nitración de tirosina involucradas en procesos fisiológicos y patológicos. (O'Flaherty y Matsushita-Fournier, 2017).

Existe cierta controversia sobre el efecto que podrían tener los PFCs en la producción de ROS durante el cultivo de líneas celulares. En este sentido, Eriksen *et al.* (2010), trabajando con células hepáticas humanas de la línea HepG2, reportaron un incremento en los niveles de ROS hasta en 1.5 veces durante la administración de PFCs, no obstante, no observaron la presencia de un daño oxidante. Por otro lado, Florentin *et al.* (2011) observaron un efecto citotóxico al exponer la misma línea celular a los PFCs, sin observar un incremento en los niveles de ROS. Las células hepáticas se caracterizan por tener una gran cantidad de enzimas de defensa antioxidante, mientras que en los espermatozoides el equilibrio REDOX puede alterarse fácilmente. Esta última observación, podría resultar de interés para establecer si en los espermatozoides se induce un cambio en la producción de ROS por la exposición a los PFCs.

## **1.5 Xenobióticos**

Los xenobióticos son sustancias químicas extrañas a los organismos, dentro de las que se incluyen compuestos vegetales y animales, medicamentos, pesticidas, cosméticos, aromatizantes, fragancias, aditivos alimentarios, productos químicos industriales y contaminantes ambientales (Patterson *et al.*, 2010). Se estima que los humanos están en contacto con millones de sustancias xenobióticas a lo largo de su vida. Existen distintas vías

por las cuales atraviesan las barreras corporales, dérmica, digestiva, respiratoria, etc., posteriormente pueden llegar al flujo sanguíneo. Algunos se metabolizan, pero la mayoría se distribuye a través de los organismos y puede acumularse en uno o en varios tejidos (Roldán Reyes, 2016).

Varios de los xenobióticos se pueden acumular en concentraciones tóxicas y causar diversas enfermedades o hasta la muerte (Croom, 2012). Los PFCs se encuentran dentro de los xenobióticos, y se ha demostrado que se acumulan en muchos organismos y que causan efectos negativos.

## **1.6 Compuestos perfluorados (PFCs)**

Los PFCs son moléculas orgánicas con átomos de flúor que sustituyen a los hidrógenos en la cadena hidrocarbonada, los enlaces carbón-flúor les brindan características fisicoquímicas particulares, entre las que destacan el efecto repelente al agua y al aceite, su gran estabilidad química y térmica, e incluso pueden actuar como surfactantes (Lau *et al.*, 2007, Guerranti *et al.*, 2013, Kato *et al.*, 2013). Gracias a sus características tan particulares, son muy utilizados a nivel mundial en la industria y productos destinados al consumo, como los repelentes de aceite y/o agua, revestimientos para utensilios de cocina, textiles, empaques de papel que requieren mantenerse secos, pinturas, lubricantes y espumas anti-incendios, entre otros productos de uso cotidiano (Foresta *et al.*, 2018).

Los PFCs son compuestos muy tóxicos, resistentes a la degradación, y con tendencia a bioacumularse en las cadenas alimentarias, se encuentran comúnmente en el suero sanguíneo humano (Lindstrom *et al.*, 2011). En monos y ratas, se han descrito efectos adversos causados por los PFCs, tales como la disminución del peso corporal, el aumento

en el peso del hígado y de la aparición de adenomas hepáticos y tiroideos. En roedores, se demostró un incremento en la incidencia de tumores en el hígado, páncreas y testículos, además de cambios en el metabolismo lipídico (Biegel *et al.*, 2001, Cook *et al.*, 1992, Sibinski *et al.*, 1987).

La vida media de los PFCs en los organismos es muy variable: en ratas macho, es aproximadamente de 6 días (Kemper y Jepson, 2003); en ratones, de 17 a 19 días (Lau *et al.*, 2005), y en humanos de 5.4 años, en promedio (Olsen *et al.*, 2007). Están en la lista de “Contaminantes Orgánicos Persistentes” de la convención de Estocolmo, debido a su toxicidad, bioacumulación y por ser contaminantes ambientales persistentes (Dorman y Reiner, 2012, Reiner *et al.*, 2014).

El sulfonato de perfluorohexano (PFHxS) y el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) pertenecen a este grupo de compuestos. Las vías principales por las que entran al organismo son: aire, agua, alimentos contaminados y por vía dérmica en personas ocupacionalmente expuestas. Estudios recientes han evidenciado el consumo de alimentos contaminados como la principal vía de exposición a PFOS y PFOA en países occidentales, estimándose una ingesta diaria de entre 2-3 ng/Kg (Fromme *et al.*, 2009).

#### **1.6.1 Sulfonato de Perfluorohexano (PFHxS)**

Es una cadena corta de ácido perfluoroalquilo, muy utilizado como surfactante en el proceso de revestimiento en alfombras, textiles y papeles, así como en producción de fluoropolímeros (Worley *et al.*, 2017). Este compuesto ha sido detectado en humanos, principalmente en la sangre del cordón umbilical, el suero y la leche materna (Lee *et al.*, 2013, Tao *et al.*, 2008). La vía de acceso al organismo es a través del aire, polvo, agua y

alimentos contaminados. Algunos estudios estiman que su vida media en el organismo es de aproximadamente 7 años (Lee y Viberg, 2013).

PFHxS suele considerarse menos tóxico que PFOS y ha reemplazado el uso de este último en muchas aplicaciones industriales (Lee, 2018). El principal fabricante de PFHxS era 3M, que en 1997 produjo unas 227 toneladas del compuesto fluoruro de sulfonilo perfluorohexano (PFHxSF) en los Estados Unidos. En la actualidad se estima que hay al menos un productor de PFHxS en Italia y algunos más en China, sin embargo, no se cuenta con información actualizada sobre los niveles de producción de estos compuestos (POPRC-14, 2018).

Estas cifras resultan de gran impacto para el medio ambiente debido a que este tipo de compuestos son considerados contaminantes ambientales emergentes, al tratarse de moléculas orgánicas artificiales, que se utilizan considerablemente en diversas industrias y productos de consumo; no son degradables y se bioacumulan en el medio ambiente. Algunas investigaciones enfocadas en estos compuestos han establecido una fuerte incidencia en el desarrollo de enfermedades humanas como consecuencia de la exposición directa o indirecta a estos contaminantes ambientales. En este sentido, en el año 2018, en la decimocuarta reunión del Comité de Examen de Contaminantes Orgánicos Persistentes o POPRC-14 por sus siglas en inglés (Persistent Organic Pollutants Review Committee), con sede en Italia, se argumentó la posibilidad de que la incidencia de este tipo de químicos en el ambiente fuera mayor con respecto a las cifras de los niveles de producción reportadas, dejando en claro la probable existencia de otras fuentes de emisión de las que no se tiene conocimiento y que deben tratar de identificarse.

Las propiedades fisicoquímicas que caracterizan a este compuesto se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de PFHxS

|                                 |                                                  |
|---------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Apariencia (20°C, 1 Atm)</b> | Polvo beige                                      |
| <b>Masa molar</b>               | 400 g/mol                                        |
| <b>Punto de fusión</b>          | 41°C                                             |
| <b>Fórmula molecular</b>        | C <sub>6</sub> HF <sub>13</sub> O <sub>3</sub> S |
| <b>Fórmula estructural</b>      |                                                  |

### 1.6.2 Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS)

Se trata de un compuesto orgánico fluorado con una columna de 8 átomos de carbono y un grupo funcional sulfonato. Es utilizado en una gran variedad de productos entre los que se incluyen: espumas anti-incendio, empaques para alimentos, tratamiento superficial de textiles, papel y metales (Trojanowicz *et al.*, 2018, Trojanowicz *et al.*, 2020). PFOS se caracteriza por ser estable a la degradación metabólica y ambiental, además de resistir la biotransformación. Se une de forma no covalente a las proteínas plasmáticas. En humanos, no se elimina de forma rápida ya que su vida media es de aproximadamente 5.4 años (Olsen *et al.*, 2007), en monos, ratas y ratones su vida media es de 121 días, 48 días y 37 días, respectivamente (Donohue, 2014). En 2009, el PFOS fue incluido en el Anexo B del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP), no obstante,

sigue produciéndose en Alemania (10 toneladas / año) e Italia (volumen de producción desconocido) y al menos en quince sitios en China (100 a 250 toneladas / año) (Lim *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2012, Oliaei *et al.*, 2013). Sus propiedades fisicoquímicas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de PFOS

|                                 |                                                  |
|---------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Apariencia (20°C, 1 Atm)</b> | Polvo blanco                                     |
| <b>Masa molar</b>               | 538 g/mol                                        |
| <b>Punto de fusión</b>          | >400°C                                           |
| <b>Fórmula molecular</b>        | C <sub>8</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>3</sub> S |
| <b>Fórmula estructural</b>      |                                                  |

## 1.7 Efectos de los PFCs en humanos

La exposición de los humanos a los PFCs se presenta, principalmente, a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados. Estos compuestos no pueden ser metabolizados, se unen a las proteínas y se detectan principalmente en sangre, hígado y riñones. En el caso de PFOS, se ha observado una asociación primordial con las superficies de las membranas celulares, acumulándose en varios tejidos corporales, principalmente de perfusión alta en los organismos expuestos (Newsted y Jones, 2005). Se ha reportado también su presencia en el aire y el polvo, razón por la cual la exposición al aire, la ingestión de polvo o el contacto dérmico con polvos o aerosoles también pueden ser una fuente de exposición (ATSDR, 2018). La eliminación de PFOS, PFHxS y PFOA del cuerpo humano tarda algunos años, mientras que la eliminación de PFCs de cadena más corta está en el rango de días. La vida

media de PFOS y PFOA en roedores es de meses, lo que difiere significativamente en los humanos (CONCAWE, 2016). PFHxS presenta una vida media de eliminación más larga (7-8.5 años), seguida por PFOS (5.4 años) (Olsen *et al.*, 2007).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas y su potencial toxicidad, se han evaluado los efectos de los PFCs sobre la salud (Lee, 2018). Se han detectado, tanto en el suero de la población general como en el de los trabajadores de la industria, en un nivel relativamente alto, comparado con otros contaminantes ambientales (Kato *et al.*, 2013). Sin embargo, también se han encontrado en la sangre del cordón umbilical y la leche materna, sugiriendo que una exposición de por vida a los PFCs puede comenzar desde el desarrollo fetal (Stahl *et al.*, 2011, Lee y Viberg, 2013). Hasta el momento, no se tiene una evidencia clara de una correlación inequívoca entre la edad y las concentraciones de PFCs en sangre. Sin embargo, se han reportado ciertas diferencias dependientes del género, mostrando que los hombres generalmente presentan concentraciones más altas de PFCs que las mujeres (Rylander *et al.*, 2009).

## **1.8 Toxicología reproductiva**

El término toxicidad reproductiva involucra a agentes químicos o físicos que interfieren con la fertilidad (Neubert, 2002). Suele ser empleado para describir los efectos adversos inducidos por xenobióticos sobre cualquier aspecto de la reproducción. Abarca todas las fases del ciclo reproductivo, incluyendo el daño en la función o capacidad reproductiva tanto masculina como femenina, la inducción de efectos adversos no hereditarios en la progenie como es el retraso en el crecimiento, efectos morfofuncionales y hasta la muerte (Corra *et*

*et al.*, 2009). Dentro de los xenobióticos se incluyen agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos (virus) o físicos (radiaciones).

Por varios mecanismos, un agente reprotóxico puede ocasionar un daño en el desarrollo de las células y en la embriogénesis, ya sea a nivel celular o subcelular. Algunos efectos negativos de los reprotóxicos son: la muerte celular, la interferencia mitótica, una función alterada de los ácidos nucleicos, la inhibición enzimática, la falta de sustratos esenciales, fallas en el aporte de energía, alteraciones en las membranas celulares y genotoxicidad, entre otros (Pimentel-Peñaloza *et al.*, 2006). En espermatozoides se ha observado que la exposición a agentes tóxicos afecta la motilidad y la capacidad para llevar a cabo la RA, evidenciando de esta manera un claro daño reproductivo, al impedir que el espermatozoide fecunde al ovocito (Maravilla-Galván *et al.*, 2009).

## **1.9 Uso de modelos animales en estudios biológicos**

Debido a las notables similitudes anatómicas y fisiológicas entre humanos y animales, particularmente mamíferos, los modelos animales han sido utilizados ampliamente para llevar a cabo investigaciones biológicas y médicas (Barre-Sinoussi y Montagutelli, 2015). Los modelos animales han sido de gran utilidad para comprender procesos patológicos, moleculares y celulares involucrados en diversas enfermedades, así como también sus posibles curas mediante la administración de diversos medicamentos. Sin embargo, ningún modelo animal único puede reproducir íntegramente los procesos mostrados en los humanos (Tang *et al.*, 2017). Es debido a esto, que muchos modelos animales son utilizados diariamente en el desarrollo de diversas investigaciones alrededor del mundo. Animales pequeños como ratones y ratas son empleados en el 95% de las investigaciones biomédicas

debido a la facilidad de manejo y alimentación al tratarse de animales pequeños, y a su ciclo reproductivo corto (Hickman *et al.*, 2017). Asimismo, otros animales son utilizados, de tamaño mediano como conejos y perros, o animales grandes como cabras, ovejas, cerdos y caballos (Moran *et al.*, 2016), por mencionar algunos.

### **1.9.1 El cerdo como modelo de estudio biológico**

El uso de modelos biológicos ha permitido el estudio del desarrollo humano y conocer la fisiología relacionada con muchas enfermedades. Dentro de estos modelos se destaca el cerdo debido a que posee semejanzas en estructura y función con los seres humanos, entre las que se destacan: la fisiología digestiva, los hábitos alimenticios, la estructura y función renal, la estructura vascular pulmonar, la propensión a la obesidad y las frecuencias respiratorias (Tumbleson y Schook, 1996). Debido a su tipo de alimentación, omnívora, se ha conseguido estudiar el efecto de xenobióticos como alcohol, tabaco, aditivos alimenticios y contaminantes ambientales (Schook, 2007). Otras investigaciones en cerdo han permitido el estudio de hormonas reproductivas, interacciones materno-fetales, desarrollo embrionario, impacto de la transgénesis en la función y calidad del esperma (Kuzmuk y Schook, 2011, Lunney, 2007). Se ha demostrado que el uso del cerdo en investigaciones relacionadas con fisiología espermática es muy prolifero, ya que es un modelo bien estudiado y documentado, que ofrece un gran volumen de eyaculado, bajo número de espermatozoides con fisiología anormal, buena motilidad espermática y son menos susceptibles a variaciones de luz, térmicas y de pH comparado con otros modelos por ejemplo el del espermatozoide de caballo (Rodriguez-Gil y Bonet, 2016, Sun y Nagai, 2003).

## 2 ANTECEDENTES

Las células sexuales son especializadas y necesarias para la reproducción y perpetuación de la especie. Para que puedan llevar a cabo correctamente su función, es necesario que no presenten ningún daño, alteración o malformación. En el caso particular del espermatozoide, para que adquiera su capacidad fecundante, requiere de la activación de una serie de cascadas complejas de regulación génica y señalización, características que los hace especialmente sensibles a la disrupción por agentes xenobióticos (Bonilla y del Mazo, 2010). Cotidianamente, se emplean alrededor de unos 1,500 productos químicos comerciales, que poseen un volumen de producción elevado superando las 10,000 toneladas por año, (Koeter, 1993) y anualmente se comercializa una gran diversidad de productos nuevos.

La exposición a estos químicos comerciales, incluidos ftalatos, glifosatos, etc., puede afectar los sistemas reproductivos, teniendo como consecuencia el desarrollo de un daño genético, que puede dar lugar a problemas de infertilidad, malformaciones, abortos espontáneos, etc. (Ahrens y Traas, 2007, Dobrzynska, 2016, Anifandis *et al.*, 2018).

El riesgo genotóxico de agentes químicos y farmacológicos sobre las células germinales actualmente es evaluado mediante ensayos *in vivo*. Sin embargo, estos ensayos tienen un costo y duración considerables, al ser necesario un número de animales de experimentación elevado, situación que resulta inviable para evaluar el riesgo genotóxico de los cientos de productos químicos producidos anualmente, además de los problemas éticos que representa el trabajo con animales. Debido a lo anterior, en los últimos años ha habido un creciente interés en el desarrollo de nuevas metodologías para llevar a cabo ensayos *in vitro*. Dichos ensayos, además de realizarse en un período corto de tiempo permiten estudiar

los mecanismos de acción de los diferentes agentes, consiguiéndose así una mejor valoración toxicológica (Hariparsad *et al.*, 2006, Lamb, 1993).

Dentro de los agentes xenobióticos utilizados con mayor frecuencia se encuentran los PFCs. Se han documentado algunos efectos adversos debidos a la exposición a los PFCs en animales de experimentación, como la hepatocarcinogénesis, alteraciones en los niveles de testosterona y estradiol, hiperplasia en células de Leydig y adenomas testiculares (Biegel *et al.*, 1995, Cook *et al.*, 1992, Shi *et al.*, 2007). Además, se han examinado los efectos de PFOS en el desarrollo de células granulares de ratas de 7 días de edad, cultivándolas por 7 días adicionales, hallándose un aumento en ROS y la translocación de la PKC (Lee *et al.*, 2012).

De manera similar, al analizar los niveles de PFCs en suero y la calidad del semen de 105 hombres daneses, Joensen *et al.* (2009) reportaron concentraciones importantes de PFOS, PFOA y PFHxS (24.5, 4.9 y 6.6 ng/mL, respectivamente). Los individuos con altos niveles de PFOS y PFOA poseían en promedio, 6.2 millones de espermatozoides normales, en comparación con los 15.5 millones de espermatozoides en aquellos individuos que mostraron bajos niveles de PFCs. Sin embargo, no se observó daño causado por PFHxS (Joensen *et al.*, 2009).

Toft *et al.* (2012) realizaron un estudio para tratar de asociar la exposición a PFCs con la calidad del semen de 588 hombres, parejas de mujeres embarazadas. La proporción de espermatozoides morfológicamente normales que encontraron fue un 35% menor con la exposición a PFOS.

La información existente acerca del efecto de los PFCs sobre la maduración de gametos es escasa, de aquí la necesidad de efectuar estudios que permitan evaluar su capacidad para

interferir en ella. Conjuntamente, resulta necesario el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos deletéreos de los PFCs. Con esta finalidad, en el presente estudio se analizarán los diversos procesos fisiológicos alterados por los PFCs durante el proceso de capacitación espermática. Este trabajo conforma parte de un proyecto que abarca también el estudio de los efectos de PFCs en ovocitos, fertilización *in vitro*, embriones y espermatozoides.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años, se han realizado estudios epidemiológicos, tanto en animales como en humanos, para investigar la relación entre la exposición a PFOS/PFHxS y los efectos en la salud como la fertilidad, el crecimiento y los biomarcadores del desarrollo. Estudios en humanos han reportado asociaciones entre PFOS y reducción en los niveles de colesterol, cambios en el peso de recién nacidos y diversos problemas tiroideos. Sin embargo, estos estudios no han permitido esclarecer el mecanismo por el cual los espermatozoides se podrían ver afectados por la presencia de PFCs. Algunos resultados en nuestro grupo de investigación sugieren la presencia de un desequilibrio en la generación de ROS, conllevando a su vez a un daño en el proceso de capacitación que requiere de una generación moderada de ROS para que este proceso se lleve a cabo adecuadamente. Por ello, en el presente estudio se realizó una evaluación toxicológica del PFHxS y el PFOS, para aclarar los efectos que producen estos químicos en el proceso de la capacitación y la RA *in vitro* en espermatozoides de cerdo. Asimismo, se estableció una relación entre la toxicidad y los niveles de ROS generados ante la exposición a ambos compuestos químicos.

## **4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Los efectos negativos de los PFCs en la espermatogénesis reportados por otros autores, nos lleva a preguntarnos:

***¿De qué manera afectan los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS al proceso de capacitación y reacción acrosomal espontánea de espermatozoides de cerdo?***

## **5 HIPÓTESIS**

Los PFCs afectan la reproducción, entonces si capacitamos a los espermatozoides de cerdo en presencia de PFCs, se encontrarán niveles elevados de ROS, así como patrones de capacitación y reacción acrosomal espontánea y de fosforilación de residuos de tirosina modificados con respecto a los normales.

## **6 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS, en la capacitación de espermatozoides de cerdo *in vitro*.

## **7 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Determinar la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), de los PFCs
- 2) Determinar el efecto de los PFCs sobre el logro de la capacitación y la RA espermática *in vitro*.
- 3) Cuantificar la generación de estrés oxidante en espermatozoides durante su exposición a los PFCs durante la capacitación *in vitro*.
- 4) Determinar los efectos de los PFCs sobre la fosforilación de proteínas durante la capacitación espermática *in vitro*.
- 5) Determinar el efecto de los PFCs en la fragmentación de ADN.

## 8 MATERIALES Y MÉTODOS

Los productos químicos fueron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO Estados Unidos), a menos que se indique lo contrario.

### 8.1 Obtención de muestra espermática, condiciones de capacitación *in vitro* y tratamiento con los PFCs

Se utilizaron cerdos sanos y fértiles de entre 1 a 4 años de edad y de distintas razas (Duroc, Pietrain e híbridos Large White × Landrace). Las muestras espermáticas se obtuvieron por el método de la mano enguantada. La fracción gelatinosa fue filtrada, dejando la fracción enriquecida espermática para su uso. Los ensayos se realizaron con duplicado técnico, en un tiempo de entre 3 y 4 horas después de la obtención de la muestra. Sólo se utilizaron las muestras con valores normozoospermicos previamente establecidos: viabilidad y motilidad >85%, concentración  $>200 \times 10^6$  espermatozoides/mL y anomalías morfológicas <15% (Alkmin *et al.*, 2013).

Después de la evaluación inicial, la muestra se centrifugó a 600 x g durante 5 minutos, el precipitado se lavó 2 veces con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se resuspendió en 1 mL de TALP-HEPES (3.1 mM KCl, 100 mM NaCl, 0.29 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES, 2.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 21.6 mM lactato de sodio, 2.1mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.035 µM rojo de fenol pH 7.4). Para su capacitación se transfirió una alícuota de  $5 \times 10^6$  espermatozoides lavados a 1 mL de medio de capacitación (MDC) consistente en TALP-HEPES suplementado con 1 mM de piruvato de sodio y 6 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) fracción V y se incubó durante 4 horas a 39 °C

en atmósfera húmeda, en ausencia o presencia de PFCs (Yoshida *et al.*, 1990, Maravilla-Galvan *et al.*, 2009, Ded *et al.*, 2019).

Para el estudio de los distintos efectos de los PFCs,  $5 \times 10^6$  espermatozoides se incubaron en medio de capacitación entre 30 minutos y 4 horas a 39 °C en atmósfera húmeda en ausencia (control) o presencia de las concentraciones de PFCs indicadas en cada estudio. Como control adicional, se incubaron los espermatozoides en medio de capacitación con 10 µL DMSO.

## **8.2 Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) durante la capacitación espermática**

Para determinar la CL<sub>50</sub>, la muestra espermática fue incubada 4 horas a 39 °C en atmósfera húmeda en MDC con concentraciones crecientes de los perfluorados. Para PFOS se utilizaron 1000, 2000 y 3000 µM, mientras que para PFHxS fueron 1000, 2500 y 5000 µM. Los controles evaluados fueron MDC en ausencia de PFCs y MDC + DMSO, para asegurar que el DMSO no generaba un efecto tóxico.

## **8.3 Viabilidad espermática**

Se utilizaron dos técnicas para evaluar la viabilidad espermática:

1) Tinción de eosina-nigrosina. Para ello, a una alícuota de 5 µL de espermatozoides lavados con PBS a 39 °C (aproximadamente 25,000 espermatozoides), se le añadieron 5 µL de una solución eosina-nigrosina (10% nigrosina y 0.67% eosina Y), mezclándose en un portaobjetos temperado a 37 °C y se les realizó un frotis. Se contaron al menos 200

espermatozoides, aquellas células teñidas de color rosa se consideraron como espermatozoides muertos (Fig. 4) (Jimenez *et al.*, 2003).

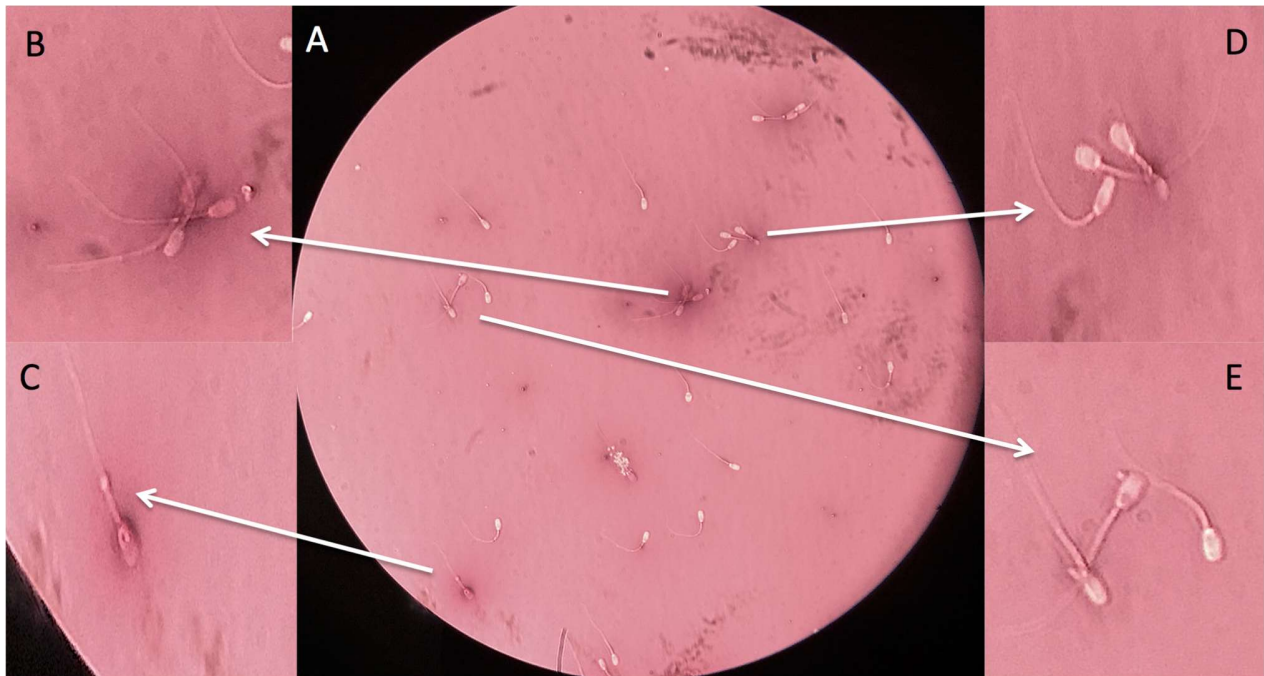


Figura 4. Prueba de viabilidad por la tinción de Eosina-Nigrosina. A) Campo completo de una preparación de viabilidad por esta tinción. B y C) Espermatozoides muertos teñidos en rosa por el paso de la Eosina a través de la membrana. D y E) Espermatozoides vivos, al no tener daño en la membrana permanecen en color blanco.

2) Tinción de yoduro de propidio-Hoechst (Fig. 5). Se colocó una alícuota de 5  $\mu$ L de espermatozoides lavados en un portaobjetos, y se mezcló con 5  $\mu$ L de una solución 10  $\mu$ M de Hoechst, tras una incubación de dos minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 5  $\mu$ L de 10  $\mu$ M de yoduro de propidio y se observaron inmediatamente en el microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot-2 con filtro ultravioleta UV-2A (Nikon, Japón). En esta técnica los espermatozoides que son teñidos en rojo por la entrada del yoduro de propidio son contados como muertos, mientras que los que solo permanecen azules por el Hoechst son contabilizados como vivos.

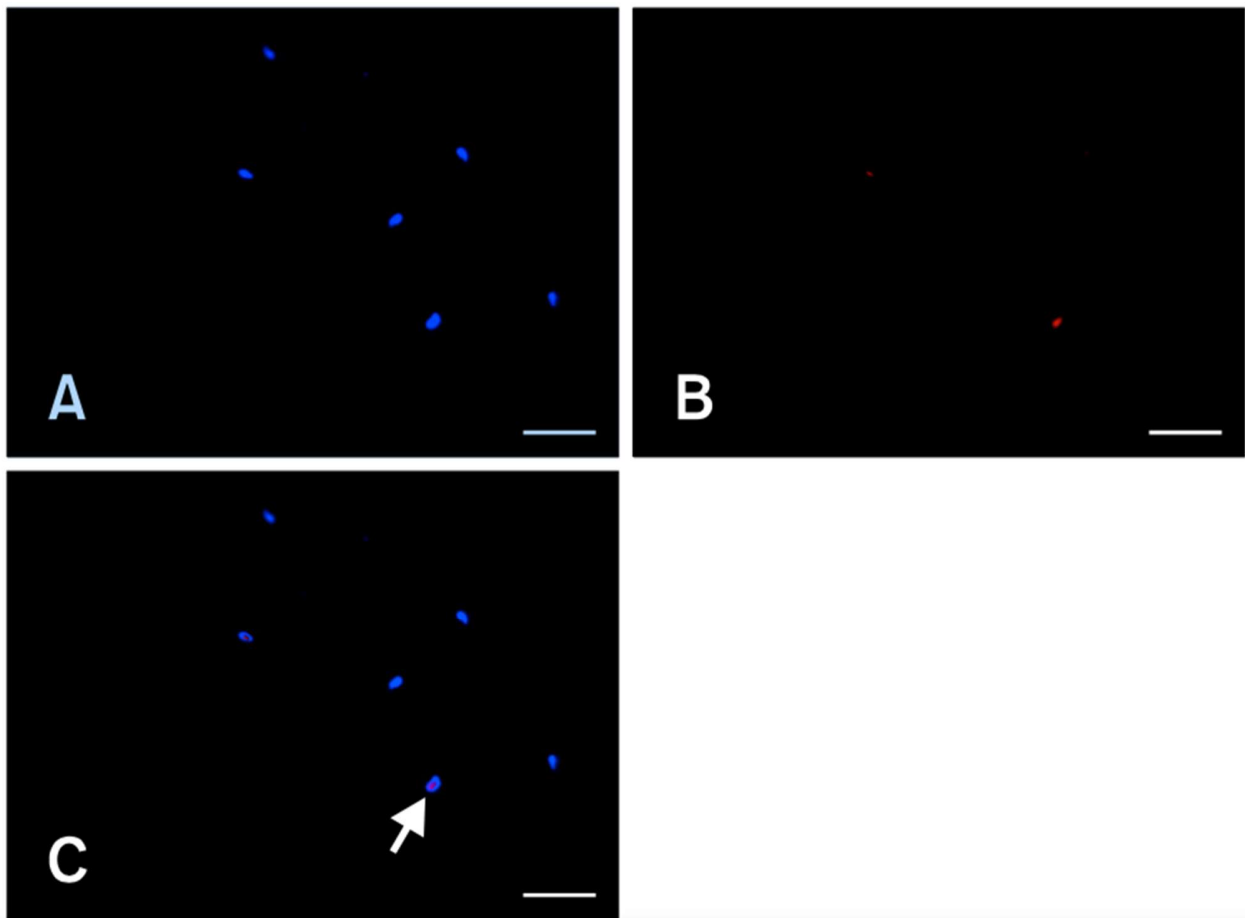


Figura 5. Imagen representativa de la tinción de yoduro de propidio-Hoechst. A) El Hoechst penetra tanto en espermatozoides vivos como muertos otorgando una tinción azul. B) La tinción de Yoduro de propidio sólo entra en espermatozoides muertos y produce una coloración roja. C) La fusión de imágenes permite ver el espermatozoide con la membrana comprometida, marcado por la flecha. Imagen ilustrativa tomada de (Diercks *et al.*, 2012).

#### 8.4 Capacitación y Reacción Acrosomal espontánea (RAe)

La capacitación y el proceso RAe se determinaron con los valores de  $CL_{50}$ ,  $\frac{1}{2} CL_{50}$  y  $\frac{1}{5} CL_{50}$  de los PFCs. Los espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados espontáneamente se determinaron por el método de clortetraciclina (CTC) (Fraser y Herod, 1990).

El método CTC permite observar 3 patrones de fluorescencia cuando el CTC está en contacto con  $Ca^{2+}$  intracelular unido a proteínas de membrana: No capacitados con

fluorescencia tenue en la cabeza, capacitados con fluorescencia intensa en la zona acrosomal y ecuatorial de la cabeza y RA con fluorescencia tenue en la zona ecuatorial (Fig. 6).

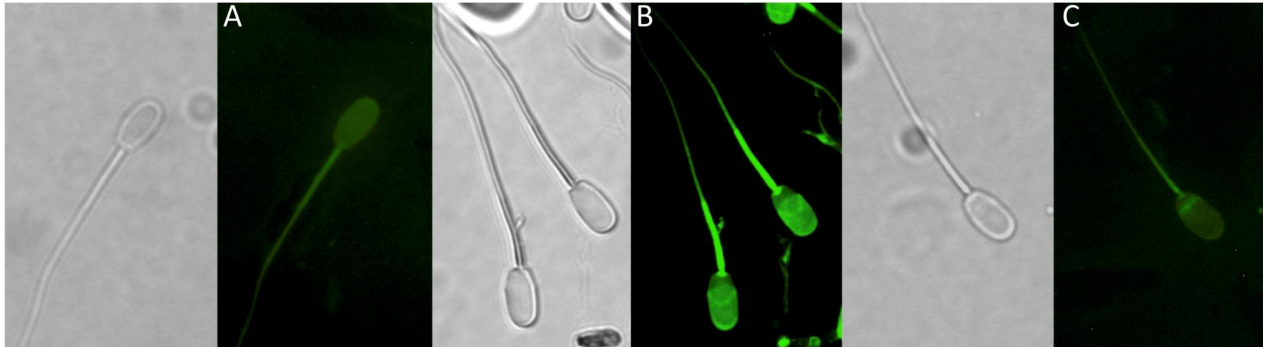


Figura 6. Patrones de fluorescencia obtenidos por la técnica de CTC. A) Patrón No capacitados, se observa fluorescencia tenue en toda la cabeza del espermatozoide. B) Patrón Capacitados, fluorescencia intensa en la zona ecuatorial y acrosomal de la cabeza. C) Espermatozoides con reacción acrosomal, fluorescencia en la zona ecuatorial y en algunas ocasiones en la zona post ecuatorial.

Se colocaron 5  $\mu$ L de espermatozoides lavados (aproximadamente 25,000) sobre un portaobjetos de vidrio precalentado y se mezclaron con 750  $\mu$ M de CTC preparado en tampón que contenía 20 mM Tris, 130 mM NaCl y 5 mM L-Cisteína. Después de 30 segundos, se adicionaron 5  $\mu$ L de glutaraldehído al 0.2% solubilizado en tampón 0.5 mM Tris, pH 7.4, montado con FluoroMount <sup>TM</sup> (F4680) y se presionó suavemente el cubreobjetos. Al menos 200 espermatozoides se contaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2, con filtro B-2A (Fraser y Herod, 1990).

Como método alternativo para medir la RAe se utilizó la tinción Hoechst-FITC-PNA (por su nombre en inglés, fluorescein isothiocyanate- conjugada con peanut agglutinin). Esta técnica se basa en la unión de la aglutinina de cacahuate a la Galactosil  $\beta$ -1,3 N-

acetilgalactosamina presente en el acrosoma, y la fluoresceína permite observar al acrosoma en microscopia de fluorescencia (Fig. 7).

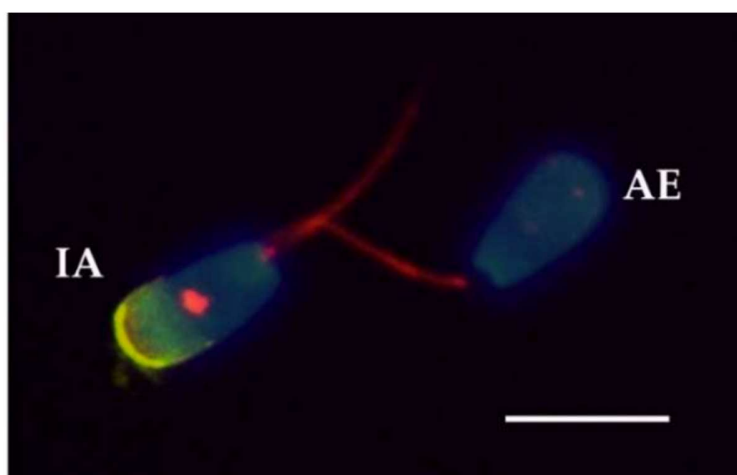


Figura 7. Imagen representativa de la técnica FITC-PNA. Las siglas IA indican un espermatozoide con el acrosoma intacto, mientras que las siglas AE son para un espermatozoide reaccionado. Imagen tomada de (Ruiz-Díaz *et al.*, 2020).

Para esta técnica, se colocó una muestra de 20  $\mu\text{L}$  (con aproximadamente 100,000 espermatozoides) en un portaobjetos de vidrio, secándose al aire a 37 °C. El portaobjetos se sumergió durante 30 segundos en metanol al 100% a -20 °C y se dejó secar al aire dentro de la cámara de extracción. Las preparaciones se almacenaron en atmósfera seca a temperatura ambiente hasta su procesamiento durante los días siguientes. Para ello, las preparaciones fueron sumergidas dos veces en PBS durante 5 minutos cada una, se eliminó el exceso de PBS y se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía FITC-PNA (15  $\mu\text{g/mL}$ ) y Hoechst (5  $\mu\text{g/mL}$ ), incubándose durante 30 minutos en cámara húmeda en la oscuridad. Finalmente, se realizó un lavado durante 10 minutos en agua destilada, los portaobjetos se secaron a 37 °C y se montó con FluoroMount <sup>™</sup> (F4680). Se contaron al menos 200

espermatozoides por microscopía de fluorescencia en un microscopio Nikon Optiphot-2, con filtro B-2A para FITC y UV-2A para Hoechst (Nikon, Japón).

### **8.5 Análisis de la producción de ROS durante la capacitación *in vitro* de espermatozoides expuestos a PFCs**

Para determinar los niveles de ROS, se utilizó el compuesto 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA), compuesto que al estar en contacto con esterasas intracelulares pierde sus acetatos, dejando al compuesto reducido y al estar en contacto con ROS se oxida y emite fluorescencia, la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a los niveles de ROS intracelulares.

Para esta técnica se siguió el protocolo previamente descrito con algunas modificaciones (Guthrie y Welch, 2006). Se preparó una solución de trabajo de 20 mM H2DCFDA disuelto en DMSO, que fue almacenada en alícuotas en la oscuridad a -20 °C. El día del experimento, las muestras espermáticas se mezclaron con Hoechst y H2DCFDA a una concentración final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL (10  $\mu$ M Hoechst y 200  $\mu$ M H2DCFDA). Los espermatozoides fueron incubados durante 30 minutos a 25 °C y luego se evaluó la fluorescencia mediante citometría de flujo, las condiciones se describen en el apartado 8.7 Citometría.

### **8.6 Análisis del efecto de los PFCs sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina**

La determinación del efecto de los PFCs en la fosforilación de tirosinas se realizó por medio de inmunocitoquímica, utilizando el protocolo descrito previamente, con algunas

modificaciones (Fabrega *et al.*, 2011). Las muestras se lavaron por centrifugación dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 2% (Merck, Calbiochem), durante 10 minutos a 37 °C. Las muestras fijadas se permeabilizaron con metanol al 90% (PanReac Química, SAU España) durante 30 minutos en hielo. Seguidamente, las muestras se lavaron en dos ocasiones con 500 µL de tampón de incubación (IB) (PBS + 1% BSA) y se resuspendieron en 90 µL del mismo tampón, para ser incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de reducir el ruido de fondo. Posteriormente, se añadieron 5 µL de anticuerpo PTyr (Anti Human-Mouse phosphotyrosine, Invitrogen 14-5001-82), incubándose durante toda la noche a 4° C. Las muestras se lavaron y se resuspendieron en 95 µL de IB, se adicionaron 5 µL de anticuerpo secundario (Alexa 488 goat anti-mouse Invitrogen A11029) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente las muestras fueron lavadas con IB y se resuspendieron en 50 µL de PBS. Finalmente, se colocó una alícuota de 5 µL en un portaobjetos de vidrio, se mezcló con 10 µM de Hoechst y se observó en microscopía de fluorescencia en el microscopio Nikon Optiphot-2 y con filtro B-2A para FITC y UV-2A para Hoechst (Nikon, Japón). Se contaron al menos 200 espermatozoides y se clasificaron con base al patrón de fluorescencia observado: 1) sin fluorescencia en la cabeza (NFH), 2) fluorescencia en el área del acrosoma (AF), 3) fluorescencia en la zona ecuatorial (EHZ) y 4) fluorescencia en la zona ecuatorial + zona del acrosoma zona (AE). Los patrones observados se obtuvieron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2, Leica, Alemania) (Fig. 8). Para determinar la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo, la muestra restante se resuspendió en IB hasta un volumen final de 500 µL.

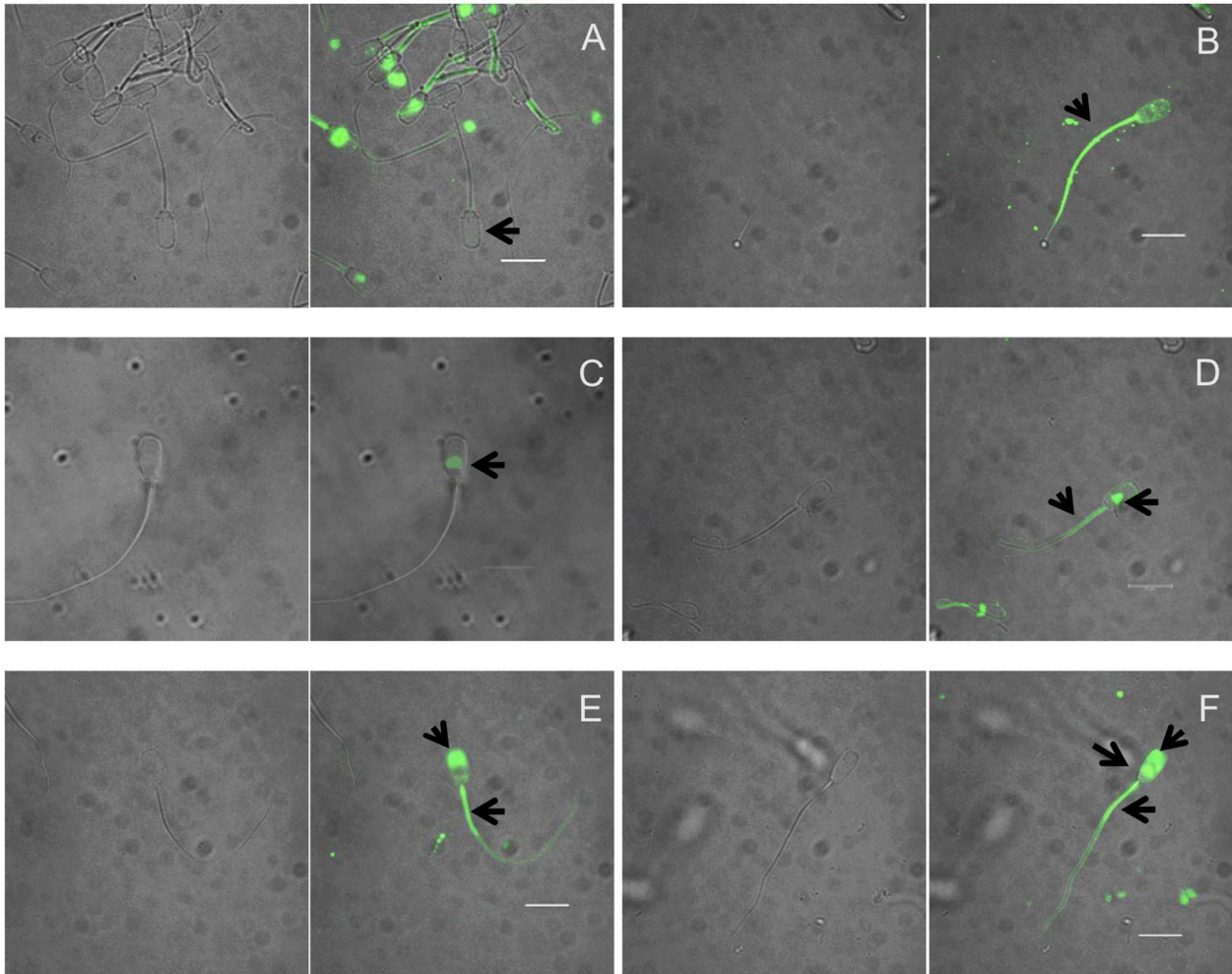


Figura 8. Micrografías de los patrones de fluorescencia en la fosforilación de residuos de tirosina en espermatozoides de cerdo durante el proceso de capacitación *in vitro*. Se encontraron seis patrones diferentes, A) Sin fluorescencia. B) Fluorescencia en flagelo. C) Fluorescencia en segmento ecuatorial. D) Fluorescencia en segmento ecuatorial y flagelo. E) Fluorescencia en acrosoma y flagelo. (F) Fluorescencia en acrosoma, segmento ecuatorial y flagelo. Los patrones previos se clasificaron en: sin fluorescencia en la cabeza (NFH) A+B, fluorescencia en el acrosoma (AF) E, fluorescencia en el segmento ecuatorial (EF) C+D y fluorescencia en el acrosoma y en el segmento ecuatorial (AE) F. —, 1  $\mu$ m.

## 8.7 Citometría de flujo

Las medias de la intensidad de fluorescencia (FI) para la inmunofluorescencia de la fosforilación de tirosina y la concentración de ROS intracelular se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA). Los espermatozoides fueron analizados en el diagrama de puntos FSC / SSC para excluir los desechos, los espermatozoides fueron confirmados con el láser violeta (405 nm) y el filtro azul (450/50 nm) para detectar la tinción nuclear con Hoechst. Se contabilizaron un total de  $1 \times 10^4$  espermatozoides por determinación. Para ambos análisis se utilizó el láser azul (488 nm) y el filtro verde (530/30 nm). Los datos adquiridos se analizaron utilizando el software FlowJo (Becton-Dickinson, EE. UU.).

## 8.8 Electroforesis de células individuales o ensayo cometa (SCGE)

Se utilizó la versión alcalina del SCGE para medir la fragmentación del ADN (Perez-Cerezales *et al.*, 2018). Para esto, se mezclaron 20,000 espermatozoides en 85  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.5% previamente disuelto en PBS. La mezcla fue colocada en un portaobjetos previamente cubierto con 1% de agarosa y se cubrió con un cubreobjetos de 22  $\times$  22 mm. Para permitir la polimerización de la agarosa LMP, los portaobjetos se dejaron en una caja húmeda a 4 °C durante la noche. Posteriormente, se retiraron los cubreobjetos y los portaobjetos fueron incubados a 37 °C durante 1 h en solución de lisis (2 M NaCl, 55 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 8 mM Tris, 4% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM DTT y 0.5 mg/mL de Proteinasa K, pH 8). A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces en solución de electroforesis alcalina (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , pH 12) y se colocaron en la cámara de electroforesis, que se llenó con la misma solución para cubrir los

portaobjetos con aproximadamente 1 cm de solución. La electroforesis se realizó durante 10 minutos a 25 V, al terminar el proceso de electroforesis, los portaobjetos se colocaron en la solución de neutralización (0.4 M Tris-HCl pH 7.5) durante 10 minutos, y las muestras fueron fijadas en metanol durante 3 minutos, dejándose secar al aire previo a la tinción con bromuro de etidio. Los cometas se observaron en microscopía de fluorescencia a 400x y se digitalizaron con una cámara digital Nikon 5100 (Nikon, Japón) acoplada al microscopio, en todos los casos bajo la misma configuración en modo manual. Se analizaron al menos 150 imágenes de cometas utilizando el software gratuito Casplab 1.2.3beta2 (CaspLab.com) (Konca *et al.*, 2003).

## **8.9 Análisis estadísticos**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. Se aplicó la prueba Probit para determinar la CL<sub>50</sub>. Para establecer diferencias en la viabilidad, el proceso de capacitación, la RAe, SCGE y fosforilación de tirosina, los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para establecer las diferencias en la producción de ROS se utilizó un ANOVA de 2 vías. Las comparaciones por pares de las medias se analizaron con una prueba HSD de Tukey con un valor de  $p \leq 0.05$ . El análisis estadístico se realizó con el software SPSS de IBM (Versión 20 para Mac OS).

## 9 RESULTADOS

En este trabajo se evidenció que la presencia de PFOS aumenta la mortalidad espermática, obteniéndose una  $CL_{50}$  de 460.55  $\mu$ M, lo que ocasiona una disminución significativa en el número de espermatozoides capacitados, inhibe considerablemente la motilidad espermática y además genera aglutinación de los espermatozoides durante el proceso de capacitación. Por otra parte, el compuesto PFHxS necesita una mayor concentración para disminuir la viabilidad espermática arrojando una  $CL_{50}$  de 1930.60  $\mu$ M, sin embargo, este compuesto no parece afectar de manera significativa el proceso de capacitación.

### 9.1 Determinación de la $CL_{50}$

Se determinó el efecto de los perfluorados sobre la viabilidad y motilidad espermática. Para ambos perfluorados, se demostró que los vehículos en que se hicieron las soluciones madre no presentaron diferencia con los controles en medio de capacitación normal.

PFOS mostró una mayor toxicidad necesitando solamente una concentración de 1000  $\mu$ M para alcanzar el 63.67% de mortalidad, mientras que con PFHxS esa concentración no causó cambios significativos comparado con el control ( $p < 0.05$ ). En el caso de PFOS, todas las concentraciones experimentales utilizadas mostraron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ), para PFHxS no se obtuvo diferencia significativa entre la concentración 1000  $\mu$ M y los controles, pero sí se observó diferencia significativa con las concentraciones experimentales más altas ( $p < 0.05$ ) (Fig. 9). Mediante el análisis de regresión PROBIT, se calcularon las  $CL_{50}$ , que resultaron de 460.55  $\mu$ M para PFOS y de 1930.60  $\mu$ M para PFHxS.

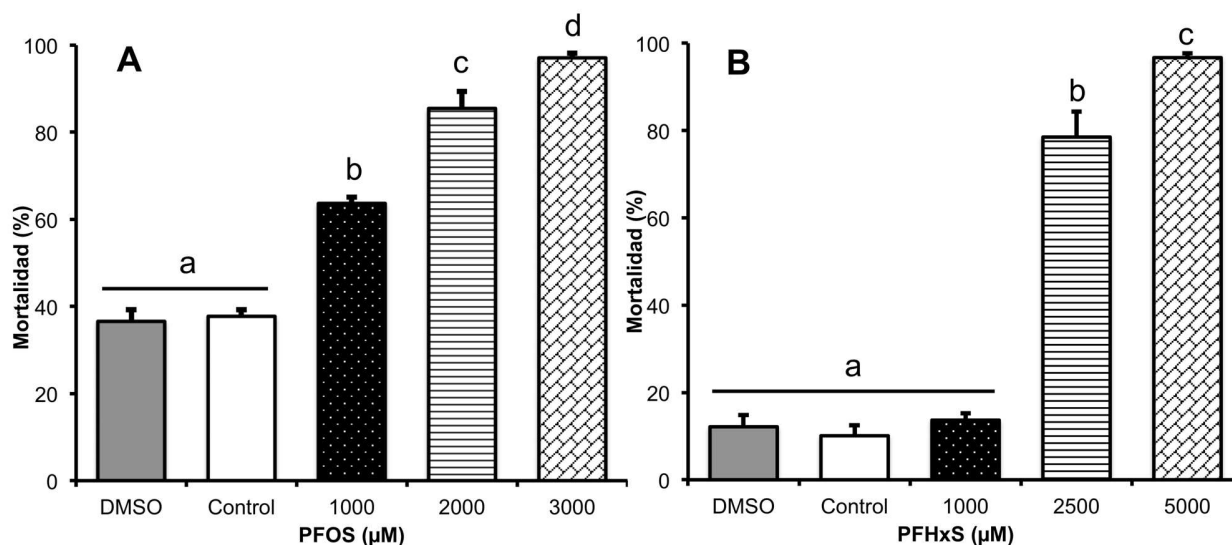


Figura 9. Efecto de (A) PFOS y (B) PFHxS sobre la viabilidad espermática. Se observó que el número de espermatozoides muertos aumenta al adicionar concentraciones crecientes del compuesto perfluorado. El análisis estadístico, mostró que entre los grupos control no hay diferencia significativa, sin embargo, entre las diferentes concentraciones de PFOS si existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## 9.2 Viabilidad de espermatozoides en concentraciones de $\frac{1}{5}$ CL<sub>50</sub>, $\frac{1}{2}$ CL<sub>50</sub> y CL<sub>50</sub> de PFCs

Una vez determinado el valor de la CL<sub>50</sub> (460.55 µM para PFOS y 1930.60 µM para PFHxS), ésta fue redondeada a la unidad más próxima para estimar con mayor precisión la quinta parte y la mitad de esta concentración, es decir  $\frac{1}{5}$  CL<sub>50</sub> = 92 µM para PFOS y 386 µM para PFHxS,  $\frac{1}{2}$  CL<sub>50</sub> = 230 µM en el caso de PFOS y 965 µM para PFHxS.

Para ambos compuestos se observó que conforme aumentaba la concentración del compuesto perfluorado, la mortalidad de los espermatozoides aumentó significativamente. En el caso de PFOS a 41.04% con  $\frac{1}{5}$  CL<sub>50</sub>, 49.08% con  $\frac{1}{2}$  CL<sub>50</sub> y 63.85% con la CL<sub>50</sub>. Con PFHxS, la mortalidad alcanzó 22.5% con  $\frac{1}{5}$  CL<sub>50</sub>, 38.6% con  $\frac{1}{2}$  CL<sub>50</sub> y 56.3% con la CL<sub>50</sub>. (Fig. 10), mientras que los controles no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p < 0.05$ ).

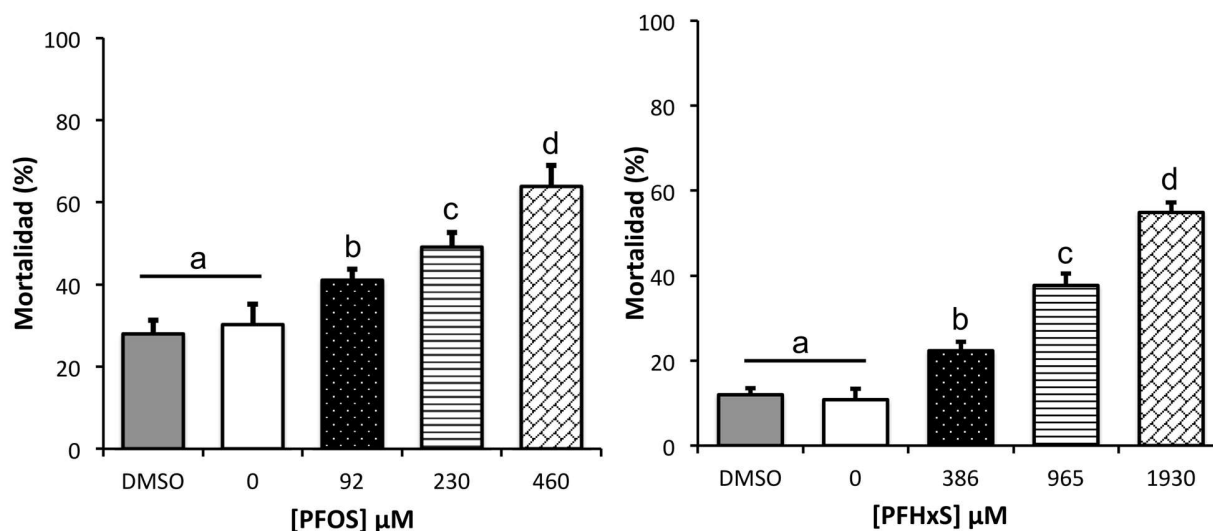


Figura 10. Efecto *in vitro* de  $1/5$  CL<sub>50</sub>,  $1/2$  CL<sub>50</sub> y CL<sub>50</sub> de los PFCs sobre la capacitación de espermatozoides de cerdo. No se observó diferencia significativa entre las muestras control, pero sí se observa diferencia significativa entre tratamientos y entre tratamientos y control ( $p > 0.05$ ).

### 9.3 Efecto de los PFCs en el proceso de capacitación espermática

Los resultados obtenidos muestran que PFOS disminuyen significativamente el proceso de capacitación, con una reducción inicial de  $70.28\% \pm 4.07$  obtenidos en los controles de capacitación a  $48.32 \pm 3.43\%$  con  $1/5$  CL<sub>50</sub>, ( $-22\%$ ,  $p < 0.001$ ),  $40.03 \pm 2.82\%$  con  $1/2$  CL<sub>50</sub> ( $-30\%$ ,  $p < 0.001$ ), y  $31.97 \pm 1.83\%$  con la CL<sub>50</sub> ( $-38\%$ ,  $p < 0.001$ ) en los espermatozoides expuestos (Fig. 11, A).

Por el contrario, la exposición a PFHxS no muestra disminución significativa del proceso de capacitación en ninguna de las concentraciones utilizadas, obteniendo entre  $69.7-71.6\%$  de capacitación (Fig. 11, B). La presencia de DMSO tampoco alteró este proceso permitiendo un  $70.61 \pm 4.37\%$  de la capacitación espermática.

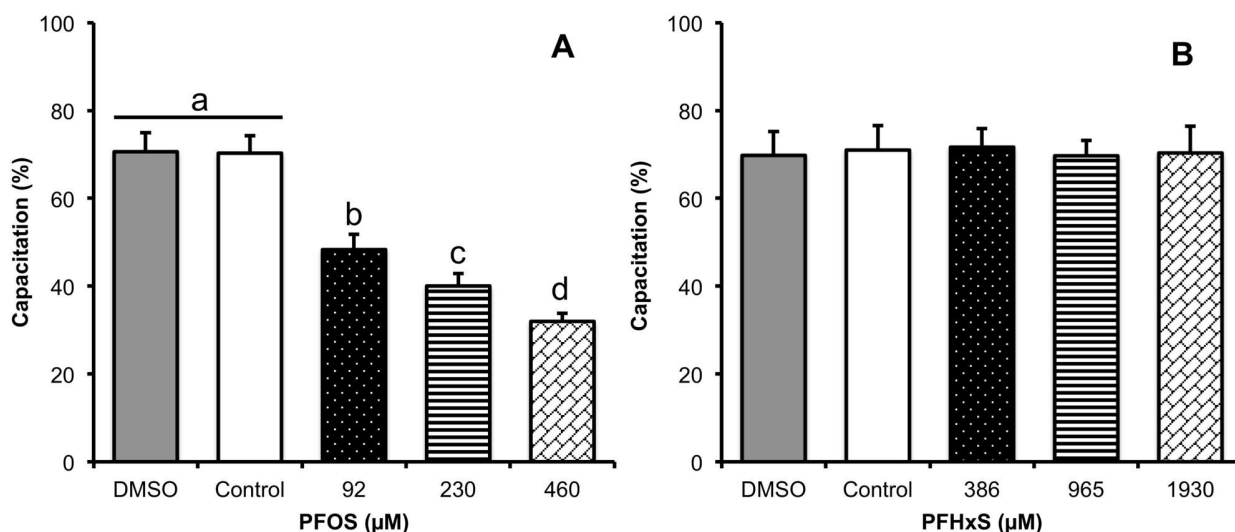


Figura 11. Efecto de la exposición a PFOS sobre el proceso de capacitación de los espermatozoides de cerdo. No se observaron diferencias significativas entre las muestras control, pero si se observa diferencia significativa entre los tratamientos y entre los tratamientos y control ( $p > 0.05$ ).

## 9.4 Efecto de los PFCs sobre el proceso de RA

### 9.4.1 Efecto del PFCs sobre el proceso de RAe

Como se mencionó previamente, la RAe se evaluó por dos técnicas diferentes. Esto se debió a que por medio de la tinción con CTC no se observaron diferencias significativas con ninguno de los PFCs bajo ninguna de las concentraciones experimentales evaluadas (Fig. 12, A y B) lo cual no parecía tener una explicación. Debido a esto, se utilizó como alternativa la tinción con FITC-PNA. Con esta técnica, los resultados indicaron que PFOS reduce significativamente la RAe, desde  $11.47 \pm 1.74\%$  obtenido en el control a un  $7.45 \pm 1.73\%$  ( $-4.02\%$ ,  $p = 0.005$ ) con  $\frac{1}{2}$  CL<sub>50</sub>, y a un  $7.09 \pm 1.59\%$  ( $-4.38\%$   $p = 0.001$ ) con la CL<sub>50</sub>. Al emplear  $\frac{1}{5}$  de la CL<sub>50</sub>, no se observó diferencia significativa respecto al control (Fig. 12, C). A diferencia de PFOS, PFHxS mostró un incremento significativo en la RAe, de  $10.46 \pm$

1.14% en el control a  $14.77 \pm 1.52\%$  (4.31%  $p = 0.001$ ) con  $1/5$  CL<sub>50</sub>,  $15.12 \pm 1.75\%$  (4.66%  $p < 0.001$ ) con  $1/2$  CL<sub>50</sub> y  $15.39 \pm 1.13\%$  (4.93%  $p < 0.001$ ) con la CL<sub>50</sub> (Fig. 12, D).

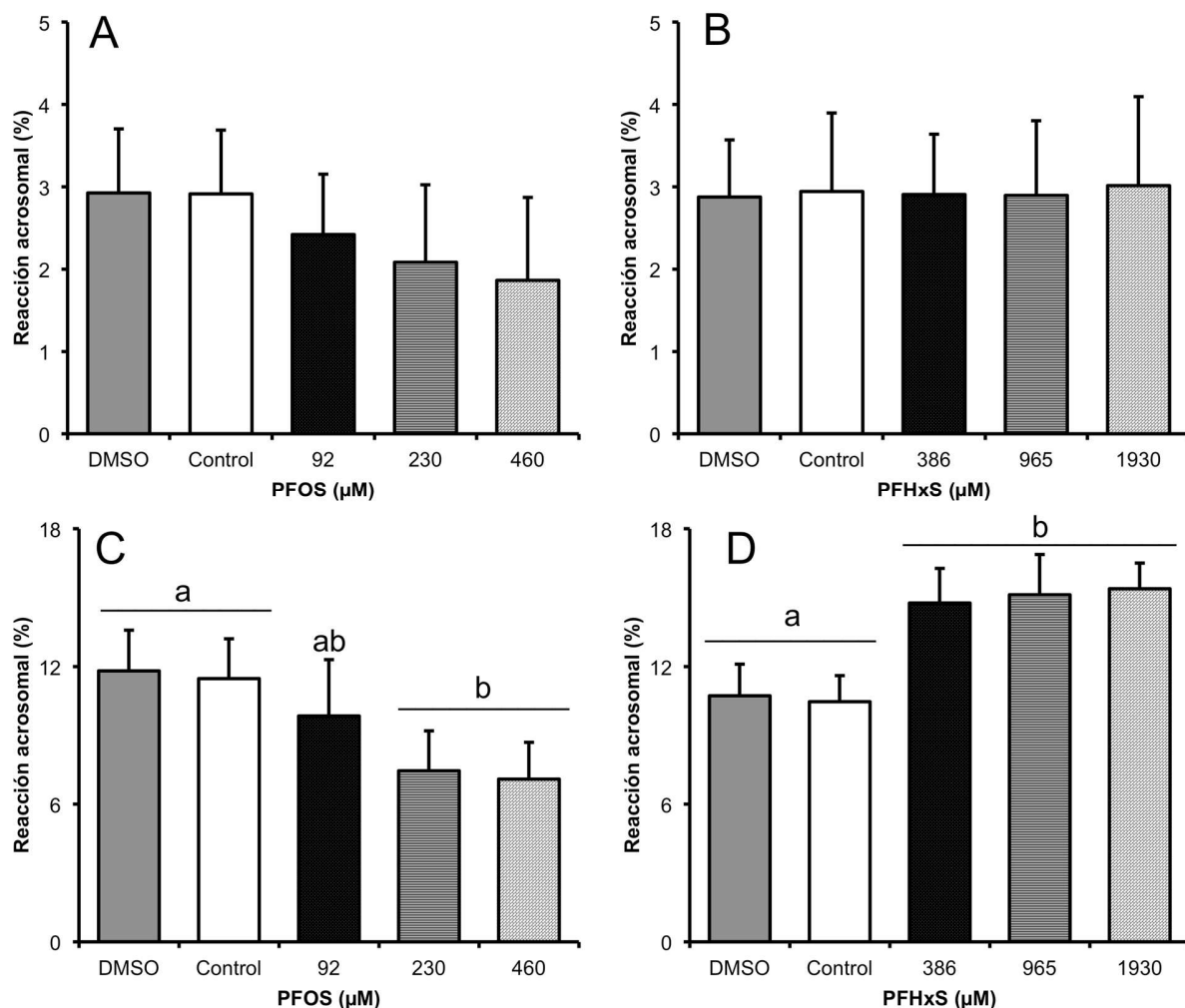


Figura 12. Efecto de los PFCs sobre la reacción acrosomal espontánea (RAe) ( $n = 6$ ). Los resultados mostrados en los paneles (A) y (B), fueron determinados por la técnica CTC; mientras que los paneles (C) y (D), por FITC-PNA. (A) La exposición frente a PFOS presenta una tendencia a disminuir la RAe, no siendo significativa en ninguna de las concentraciones evaluadas. (B) La exposición a PFHxS no afecta la RAe en ninguna de las concentraciones analizadas. (C) PFOS muestra una disminución significativa en la RAe al usar desde  $1/2$  CL<sub>50</sub>, mientras que con  $1/5$  CL<sub>50</sub> no difiere significativamente del control. (D) PFHxS, aumenta significativamente la reacción del acrosoma en todas las condiciones probadas, no hubo diferencia significativa entre los controles. <sup>a, b</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 9.4.2 Efecto de PFOS sobre el proceso de RA inducida

Para evaluar el efecto de las concentraciones subletales de PFOS sobre la RA inducida de los espermatozoides, al término de las 4 horas del proceso de capacitación, se adicionaron 10 mg/mL de progesterona y se incubó durante 20 minutos adicionales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto *in vitro* de PFOS sobre el proceso de reacción acrosomal inducida de espermatozoides de cerdo.

| Respuesta observada    | Espermatozoides con reacción acrosomal inducida (% $\pm$ D.E.) |                               |                               |                               |                               |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                        | Controles                                                      |                               | PFOS ( $\mu$ M) *             |                               |                               |
|                        | MDC                                                            | MDC +DMSO                     | 96                            | 240                           | 480                           |
| Sin capacitar          | 17.91 $\pm$ 4.55                                               | 42.50 $\pm$ 4.23              | 46.75 $\pm$ 3.60              | 66.57 $\pm$ 3.46              | 70.12 $\pm$ 2.70              |
| Capacitados            | 54.96 $\pm$ 1.56 <sup>A</sup>                                  | 53.93 $\pm$ 4.39 <sup>A</sup> | 37.97 $\pm$ 2.84 <sup>B</sup> | 30.26 $\pm$ 4.19 <sup>C</sup> | 26.40 $\pm$ 2.97 <sup>C</sup> |
| Con reacción acrosomal | 27.12 $\pm$ 3.53 <sup>A</sup>                                  | 26.96 $\pm$ 5.51 <sup>A</sup> | 15.26 $\pm$ 3.74 <sup>B</sup> | 3.15 $\pm$ 0.44 <sup>C</sup>  | 3.39 $\pm$ 1.56 <sup>C</sup>  |

\*Condición de ensayo + 10 mg/mL de progesterona

A, B, C Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas  $p < 0.05$ .

Dentro del grupo control se observó que el porcentaje de espermatozoides que mostraron RA fue de 27.12%, sin embargo, tras su exposición ante una concentración de 96  $\mu$ M de PFOS los espermatozoides reaccionados disminuyeron a un 15%, de manera que es posible establecer que con  $1/5$  de la  $CL_{50}$  de PFOS se registró un efecto significativo sobre la RA inducida. De manera general, a mayores concentraciones de PFOS, fue observada una disminución considerable en los espermatozoides que pudieron activar la RA.

## 9.5 Efecto de los PFCs sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina

Este parámetro fue evaluado mediante 2 técnicas, la IF se evaluó mediante citometría de flujo, y los patrones de fluorescencia por microscopía de fluorescencia.

### 9.5.1 Citometría de flujo

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina presentó un aumento significativo de  $398 \pm 23.30$  FI en T0 a  $711.67 \pm 120.02$  FI en el control de capacitación,  $726 \pm 67,45$  FI con CL<sub>50</sub> PFHxS y  $610 \pm 38,57$  con CL<sub>50</sub> PFOS ( $p < 0.05$ ) (Fig. 13).

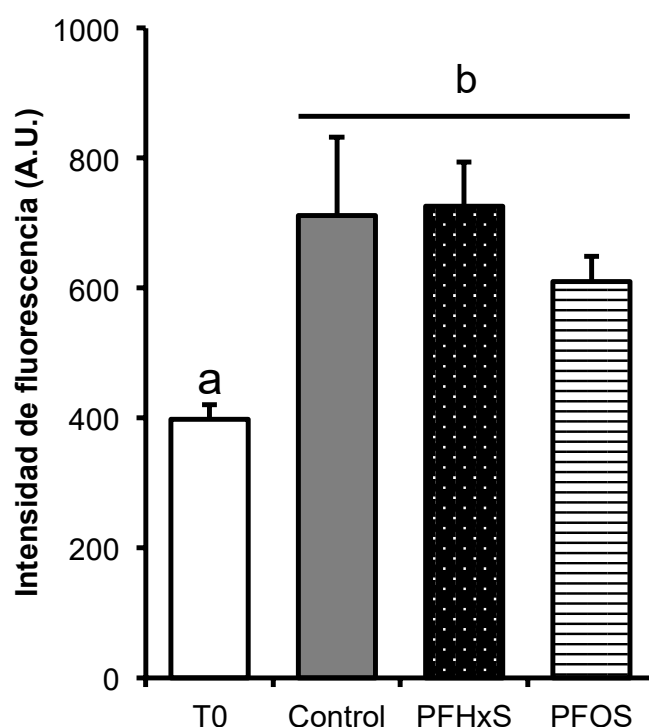


Figura 13. Determinación de intensidad de fluorescencia en fosforilación de proteínas por citometría de flujo. Se obtuvo diferencia significativa entre los espermatozoides sin capacitar a T0 y todas las condiciones de capacitación utilizadas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las condiciones de capacitación probadas. La intensidad de fluorescencia fue determinada como unidades arbitrarias (AU). <sup>a, b</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 9.5.2 Microscopia de fluorescencia

Para esta metodología los patrones se distribuyeron en 4 grupos, dependiendo donde presentaban fluorescencia (Tabla 4).

- Patrón de NFH (sin fluorescencia en la cabeza del espermatozoide). No presentó diferencias significativas entre T0, Control de capacitación y PFHxS ( $9.51 \pm 1.03\%$ ,  $12.15 \pm 0.80\%$  y  $12.69 \pm 1.50\%$ ), mientras que PFOS presentó un aumento significativo ( $12.69 \pm 1.50\%$ ) comparado con T0 y PFHxS, pero este aumento no es significativo comparado con el control ( $p=0.025$ ).
- Patrón AF (Fluorescencia en la zona acrosomal). Todas las condiciones de capacitación (Control  $5.24 \pm 1.48\%$ , PFOS  $3.0 \pm 1.46\%$  y PFHxS  $1.28 \pm 1.29\%$ ) mostraron una disminución significativa en este patrón comparado con T0  $14.42 \pm 0.75\%$ . No se encontró diferencia significativa entre control y PFOS ( $p<0.001$ ).
- Patrón EHZ (Fluorescencia en la zona ecuatorial de la cabeza). T0 ( $75.62 \pm 0.98\%$ ) y PFOS ( $71.06 \pm 2.50\%$ ) no presentan diferencia significativa entre sí. El control ( $65.38 \pm 1.98\%$ ) muestra una disminución significativa comparado con T0, mientras que PFHxS ( $81.6 \pm 1.87\%$ ) presenta un aumento significativo ( $p<0.001$ ).
- Patrón AE (Fluorescencia en la zona acrosomal y ecuatorial). Se presentan incrementos significativos en todas las condiciones de capacitación (Control  $17.23 \pm 0.74$ , PFOS  $13.26 \pm 0.73$  y PFHxS  $7.32 \pm 1.25$ ) comparado con T0 ( $0.45 \pm 0.79$ ) ( $p<0.001$ ).

Tabla 4. Efecto de los PFCs en los patrones de fosforilación de residuos de tirosina en espermatozoides de cerdo.

| Tratamiento | Patrones de fosforilacion en Tirosina |   |      |               |       |   |      |               |       |   |      |              |
|-------------|---------------------------------------|---|------|---------------|-------|---|------|---------------|-------|---|------|--------------|
|             | NFH                                   |   |      |               | AF    |   |      |               | EHZ   |   |      |              |
| T0          | 9.51                                  | ± | 1.03 | <sup>a</sup>  | 14.42 | ± | 0.75 | <sup>a</sup>  | 75.62 | ± | 0.98 | <sup>a</sup> |
| Control     | 12.15                                 | ± | 0.80 | <sup>ab</sup> | 5.24  | ± | 1.48 | <sup>bc</sup> | 65.38 | ± | 1.98 | <sup>b</sup> |
| PFOS        | 12.69                                 | ± | 1.50 | <sup>b</sup>  | 3.00  | ± | 1.46 | <sup>bc</sup> | 71.06 | ± | 2.50 | <sup>a</sup> |
| PFHxS       | 9.81                                  | ± | 0.69 | <sup>a</sup>  | 1.28  | ± | 1.29 | <sup>c</sup>  | 81.6  | ± | 1.87 | <sup>c</sup> |

La capacitación espermática se realizó en el MDC a 39 °C durante 4 h. Ambos PFCS se utilizaron en su correspondiente valor de CL<sub>50</sub>, para PFOS 460.55 µM y para PFHxS 1930.60 µM. Tratamientos: T0, espermatozoides no capacitados. Control, espermatozoides capacitados sin PFCS. PFOS y PFHxS.

Patrones: NFH, Sin fluorescencia en la cabeza del espermatozoide; AF, fluorescencia en el acrosoma; EHZ, fluorescencia en la zona ecuatorial del espermatozoide; AE, fluorescencia en la zona acrosomal y ecuatorial de la cabeza del espermatozoide.

a, b, c, d Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa.

## 9.6 Cuantificación de ROS

Para este estudio se utilizaron las CL<sub>50</sub> de ambos PFCs, y se analizó el efecto que presentaban a 0, 30 y 120 minutos. Los grupos fueron analizados estadísticamente de la siguiente forma: 1) Efecto de los diferentes PFCs y el control en cada tiempo de incubación. 2) Efecto de cada PFCs o el control entre los diferentes tiempos de incubación. En el modelo de estudio, ambos compuestos aumentaron significativamente la producción de ROS después de 30 minutos de exposición en comparación con el control ( $p < 0.05$ ) (Fig. 14). Tras dos horas de exposición, las ROS disminuyeron, pero siguieron siendo significativamente más altas que el control en el caso de PFHxS ( $p < 0.05$ ). De la misma forma, sólo PFHxS, mostró diferencia significativa en los niveles de ROS entre los diferentes tiempos de incubación ( $p < 0.05$ ).

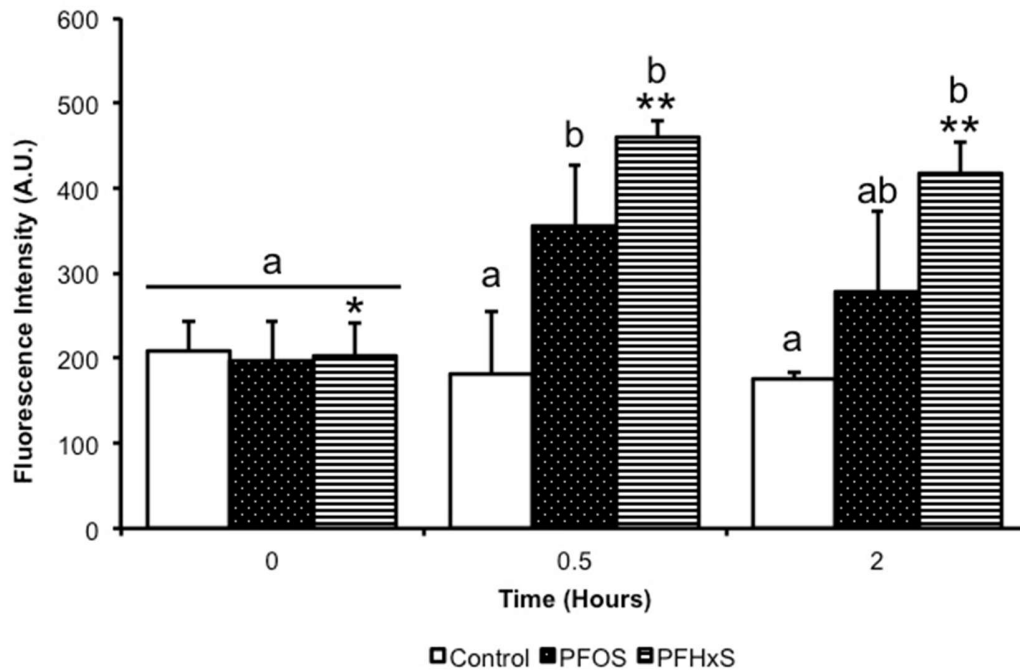


Figura 14. Producción de ROS en espermatozoides durante el proceso de capacitación. Se observa un aumento significativo en ROS a los 30 minutos de exposición frente a ambos compuestos PFCs. A las 2 horas, el aumento de ROS provocado por el tratamiento con PFOS ya no es significativo comparado con el control. <sup>a, b</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en el mismo tiempo de incubación. \*, \*\* Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas con el mismo tratamiento a diferente tiempo de incubación. ( $p < 0.05$ ).

## 9.7 Cuantificación de daño al ADN de espermatozoides

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron las mismas condiciones de capacitación antes mencionadas, en este caso el T0 corresponde a espermatozoides lavados y resuspendidos en MDC antes de su incubación, el grupo control son espermatozoides capacitados durante 4 h en ausencia de PFCs y los grupos PFOS y PFHxS son espermatozoides capacitados durante 4 h en presencia del respectivo PFCs. La exposición de los espermatozoides a ambos PFCs ocasionó un aumento en la producción de ROS. Se observaron daños significativos causados por la exposición a ambos compuestos. El compuesto que más daño

causó a los espermatozoides fue PFHxS (Fig. 15), lo que aumentó en un 20% más el daño del ADN, mientras que PFOS aumentó 10% adicional, en comparación con el control, donde sólo se registró alrededor de un 5% ( $p < 0.05$ ). El daño genómico puede estar relacionado con un aumento en ROS causado por los PFCs utilizados en este estudio.

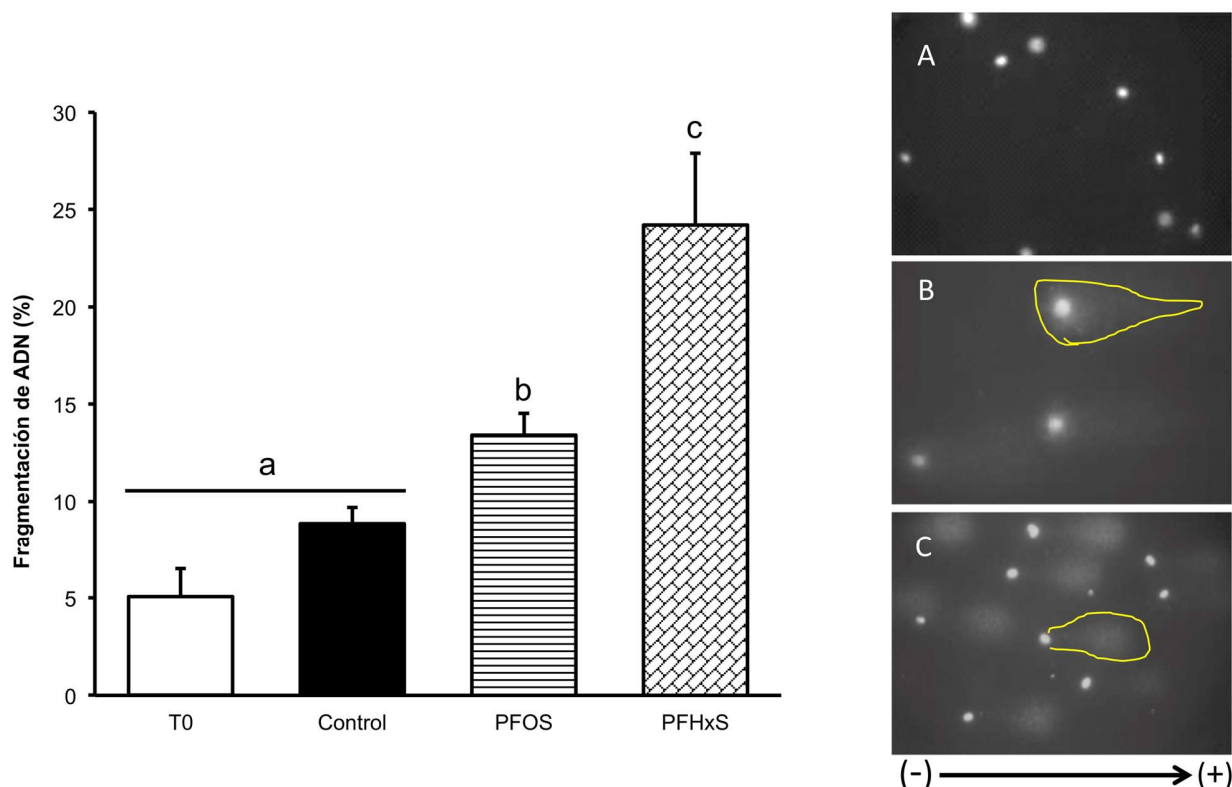


Figura 15. Proporción de espermatozoides con DNA fragmentado determinado por ensayo cometa. Se observa que la fragmentación de ADN incrementa tras la exposición a ambos PFCS. La mayor fragmentación se presenta con la exposición a PFHxS. En las micrografías, A) se observa una muestra sin fragmentación de ADN, B) Muestra con fragmentación media de ADN, correspondiente a la exposición de PFOS, C) Muestra con alta fragmentación, correspondiente a la exposición de PFHxS. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup> Diferentes superíndices indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 10 DISCUSIÓN

La presencia y los efectos tóxicos de los PFCs en seres humanos y en modelos celulares y animales son preocupantes ya que se encuentran en productos usados de manera cotidiana, a pesar de que se encuentran enlistados como “Contaminantes Orgánicos Persistentes”, y siguen produciéndose y utilizándose ampliamente. Joensen *et al.* (2009) encontraron, en hombres jóvenes adultos, niveles de 24.5 ng/mL y 6.6 ng/mL de PFOS y PFHxS, respectivamente, en suero de sangre. En personal ocupacionalmente expuesto se han encontrado concentraciones de PFOS y PFHxS de 435 µg/L (Calafat *et al.*, 2007) y el máximo registrado para PFHxS fue de 423 ng/mL en una familia canadiense que trabajaba en mantenimiento de alfombras (Beesoon *et al.*, 2012).

En este trabajo, los dos compuestos analizados presentaron toxicidad moderada en espermatozoides, por lo que su CL<sub>50</sub> estuvo en el intervalo de 0.5-2 mM. Esto puede atribuirse al hecho de que los espermatozoides se incubaron con los PFCs solo de 30 a 240 minutos. A pesar de no ser tan tóxicos como se esperaba, la mortalidad de los espermatozoides causada por los PFCs fue significativa. En modelos animales, PFOS y PFOA han demostrado tener un efecto tóxico moderado. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) para PFOS ha sido reportada en 251 mg/kg de peso corporal para una única dosis oral en ratas. Los valores DL<sub>50</sub> para PFOA varían de 430 a 680 mg/ kg de peso corporal, con un promedio de 540 mg/kg de peso corporal por día (EFSA, 2008).

De acuerdo con la búsqueda realizada, es el primer estudio donde se prueban los PFCs en células en cultivo de espermatozoides. Sin embargo, en otros modelos celulares, Slotkin *et al.* (2008) evaluaron la neurotoxicidad *in vitro* de PFOS, PFOA, PFOSA (perfluorooctano sulfonamida) y PFBS (perfluorobutano sulfonato) en células PC12 no diferenciadas y

diferenciadas. Llegaron a la conclusión de que cada PFC ejercía efectos distintos sobre esas células. En particular, PFOSA tuvo el efecto más fuerte, seguido de PFOS, PFBS y, finalmente, PFOA. Se descubrió que el PFOSA disminuye la síntesis de ADN y la viabilidad celular y aumenta el estrés oxidante. Propusieron que el efecto tóxico de PFOSA podría asociarse con su mayor hidrofobicidad, lo que le permite un acceso fácil a la membrana celular. Por su parte Liao *et al.* (2008), quienes evaluaron los efectos de los PFCs sobre las neuronas del hipocampo de las ratas, también establecieron que los efectos observados dependen de la longitud de las cadenas de carbono y de los grupos funcionales presentes en las cadenas de alquilo. Examinaron la influencia de los PFCs en la transmisión sináptica, la corriente de calcio y el crecimiento de neuritas. Los resultados obtenidos, mostraron que los compuestos de cadena más larga, y por lo tanto más hidrofóbicos, o con un grupo sulfonato, ejercieron efectos más fuertes respecto a los PFCs de cadena corta con un grupo carboxilato (Liao *et al.*, 2009). En nuestro trabajo, en los espermatozoides de cerdo, se observó que PFOS tiene mayor toxicidad que PFHxS, un hallazgo que puede estar correlacionado con su mayor hidrofobicidad ya que PFOS tiene 8 carbonos y PFHxS solamente 6.

A pesar de los numerosos estudios y modelos biológicos empleados para elucidar los efectos tóxicos de los PFCs, en espermatozoides sólo se habían descrito efectos en su morfología. Tomando algunos ejemplos, en el espermatozoide humano, Louis *et al.* (2015), evaluaron la relación existente entre siete diferentes PFCs: Acetato de 2-(N-etil-perfluorooctanosulfonamida) (Et-PFOSA-AcOH), Acetato de 2-(N-metil-perfluorooctanosulfonamida) (Me-PFOSA-AcOH), Perfluorodecanoato (PFDeA), Perfluorononanoato (PFNA), PFOSA, PFOS y PFOA, y los relacionaron con las variables

de la calidad del semen de 501 hombres de parejas que planeaban el embarazo en los Estados Unidos. Sus hallazgos mostraron que, a excepción de Et-PFOSA-AcOH, los perfluorados analizados provocaron la disminución de la calidad del semen, asociado con malformaciones claras en la cabeza y morfología del espermatozoide (incremento de espermatozoides inmaduros) (Louis *et al.*, 2015). Otra alteración evidente fue el enrollamiento del flagelo por los mismos PFCs, los autores argumentan que no existen normas clínicas para este parámetro, pero concuerdan con las observaciones de Durutovic *et al.* (2013), en cuanto a que las características que afectan la cola, pueden proporcionar información relevante sobre los mecanismos subyacentes durante el proceso de maduración y la fertilidad final.

Así mismo, de los PFCs evaluados, PFOS disminuyó significativamente la calidad del semen, asociado con un incremento en espermatozoides bicefálicos e inmaduros. No encontraron evidencia de fragmentación de ADN espermático; sin embargo, en nuestro estudio PFOS sí se produjo fragmentación del ADN, resultado que puede estar dado por el uso de una concentración mayor del tóxico en el presente estudio ya que la concentración de PFOS del estudio de Louis *et al.*, (2015) fue de 17.39 ng/mL de semen en un estudio crónico, en dónde el ADN puede repararse. Resulta necesario un seguimiento del impacto de los cambios en el semen sobre la salud reproductiva masculina o la fecundidad de las parejas, provocados por la presencia de PFCs.

Hasta la fecha, no se había estudiado el efecto tóxico que los PFCs pueden causar sobre la fisiología de la capacitación espermática; por esta razón y para discutir los mecanismos alterados por estos compuestos, comparamos el efecto de los PFCs en otros modelos

animales y celulares para intentar buscar una relación con la alteración en los procesos de capacitación espermática.

Una de las metodologías más empleadas para determinar capacitación en espermatozoides es la técnica de CTC, que permite diferenciar 3 patrones de fluorescencia que corresponden a espermatozoides no capacitados, capacitados y con RAe. Los patrones fluorescentes se producen cuando el CTC están en contacto con  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular unido a proteínas de membrana (Ward y Storey, 1984). PFOS afectó poco los patrones de fluorescencia en espermatozoides y PFHxS, en absoluto, y tampoco se observaron cambios en la proporción de RAe con ninguno de los PFCs estudiados.

Es posible que la falta de espermatozoides capacitados se deba a que los PFCs interfieran con el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio hacia el interior del espermatozoide, o con la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  con las proteínas de membrana, lo que no nos permitió observar cambios sustanciales con la CTC. En otros modelos celulares se ha encontrado una alteración en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , por ejemplo un estudio realizado con células madre de médula ósea, hBMSCs, mostró que PFHxS aumentó el transporte de calcio (Pan *et al.*, 2019). PFOS por su parte, tuvo un efecto negativo sobre la sinaptogénesis, inhibiendo el crecimiento de neuritas, efecto que parece estar asociado con la desregulación del calcio en el hipocampo (Liao *et al.*, 2008). Como lo demuestra dicho trabajo, ambos compuestos modifican la regulación y probablemente dañen los canales o la redistribución interna de  $\text{Ca}^{2+}$ . Todos estos resultados indican claramente que los PFCs alteran el transporte y la distribución de calcio en varios modelos celulares, esto también podría afectar a los espermatozoides, donde la exposición a PFHxS tuvo un efecto más evidente.

La Rae puede analizarse por medio de la tinción de PNA-FITC para determinar el estado del acrosoma de las muestras y observar la RAe de una mejor manera. El acrosoma es una gran vesícula secretora, bioquímicamente similar a un lisosoma y se forma como un producto del aparato de Golgi (Wassarman, 2001). Contiene dos membranas, una interna y otra externa, y un componente principal es el azúcar galactosil  $\beta$ -1,3 N-acetil galactosamina, que se une específicamente a la aglutinina de cacahuete conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) permitiendo observar la integridad del acrosoma (Kopf, 2001, Rajabi-Toustani *et al.*, 2019). Usando este método, observamos efectos opuestos entre PFOS y PFHxS. Se observó que los espermatozoides con RAe disminuían significativamente cuando se exponían a  $\frac{1}{2}$  CL<sub>50</sub> de PFOS. Por el contrario, la exposición a  $\frac{1}{5}$  de la CL<sub>50</sub> de PFHxS aumentó la RAe significativamente. Los hallazgos sobre una mayor toxicidad de PFOS respecto a PFHxS, permitirían asumir la posibilidad de que PFOS induzca la muerte de los espermatozoides antes de que realicen la reacción del acrosoma. Por su parte PFHxS podría requerir más tiempo para ocasionar la muerte de los espermatozoides, permitiendo que completen la RAe.

Cuando el espermatozoide tiene una capacitación correcta, la motilidad se hiperactiva. Este proceso está dado por la fosforilación de proteínas localizadas en el flagelo. Las señales recibidas en la membrana plasmática activan las cascadas de señalización para la hiperactivación de la motilidad (Xia y Niu, 2017). Además, sabemos que la fosforilación de tirosina es esencial para fertilizar el ovocito, ya que está involucrada también en la RA y la fusión de gametos (Naz y Rajesh, 2004, Jones *et al.*, 2008). Algunos autores sostienen que las ROS actúan positivamente sobre la fosforilación de tirosina, como se ha demostrado en

espermatozoides de muchas especies como humanos, caballos, toros y ratas (Aitken, 2017), incluidos los de cerdo (Boerke et al., 2013).

El análisis de la fosforilación de tirosina por citometría de flujo realizado en este trabajo no evidenció diferencias significativas en la fluorescencia total en ninguna de las condiciones estudiadas. Sin embargo, los análisis por microscopía de fluorescencia revelaron diferencias significativas en la distribución de proteínas fosforiladas ubicadas en el acrosoma y la zona ecuatorial de la cabeza de los espermatozoides cuando se incubaron con la CL<sub>50</sub> de PFHxS. Además, la incubación con la CL<sub>50</sub> de PFOS y PFHxS causó una inhibición significativa en el patrón de fosforilación de tirosina completa (zona de acrosoma + zona ecuatorial de la cabeza). Estos resultados parecen sugerir que los PFCs frenan el proceso de capacitación al modificar la fosforilación de residuos de tirosina e inhibir el cambio de fosforilación específicamente de proteínas de la zona ecuatorial y de la zona acrosomal de la cabeza, no permitiendo obtener el patrón de fosforilación en las zonas ecuatorial+ acrosomal+ flagelar. Este efecto de los PFCs sobre la fosforilación de tirosina de los espermatozoides no había sido reportado previamente. Gao *et al.* (Gao *et al.*, 2017) determinaron que PFOS daña las células de Sertoli al alterar el citoesqueleto de actina por la desregulación de las enzimas de fosforilación p-Akt1-S473 y p-Akt2-S474. Argumentaron que SC79, un activador Akt1 / 2, bloqueó el daño en células de Sertoli al evitar la desorganización de la F-actina inducida por PFOS. Por su parte, Qiu *et al.* (Qiu *et al.*, 2016) propusieron que la diana de PFOS podría ser p38 / ATF2, y que esto se asociaría con un aumento en la fosforilación de forma dependiente de la dosis y del tiempo y que produciría un daño en la barrera hematotesticular. Por el contrario, este no parece ser el mismo mecanismo en el modelo que utilizamos, ya que la fosforilación no se incrementó.

Con el incremento en la motilidad espermática es necesario que el espermatozoide produzca más energía para su movimiento, asociado con el aumento en la producción de energía también se exhibe un incremento en las ROS intracelulares. El efecto de los PFCs en la producción de ROS y su efecto celular se han estudiado, por ejemplo, en neuroblastos SH-SY5Y, donde el tratamiento con 25  $\mu$ M de PFOS generaron ROS de manera significativa y causaron efectos neurotóxicos (Chen *et al.*, 2014). En las células hepáticas, PFOS causó citotoxicidad asociada con ROS y peroxidación lipídica con la disminución de glutatión en los hepatocitos. El uso de antioxidantes ocasionó un descenso en la citotoxicidad (Khansari *et al.*, 2017). PFHxS tuvo efectos apoptóticos en células granulares cerebelosas y aumentó la activación de ERK1 / 2, JNK y p38 MAPK. En este caso, el tratamiento con antioxidantes también evitó los efectos adversos (Lee *et al.*, 2014). En espermatozoides de ratón, Zhang *et al.* (2020), demostraron que el compuesto organofosforado Clorpirifós (CPF), reduce la fertilidad masculina, relacionándolo con la disminución de motilidad espermática causada por el daño a nivel mitocondrial, lo que causó un incremento en los niveles oxidantes durante la maduración espermática.

Las ROS regulan procesos clave en la capacitación espermática ya que, muchos estudios han demostrado, que un aumento en su concentración aumenta la capacitación y la adición de antioxidantes la reduce (Ford, 2004, Villegas *et al.*, 2003, Bansal y Bilaspuri, 2010). En el modelo usado en nuestro estudio y en comparación con los controles, ambos compuestos aumentaron significativamente las ROS después de 30 minutos de exposición. A las 2 horas de exposición, los niveles de ROS disminuyeron. Cuando se analizó el efecto con la CL<sub>50</sub> de PFHxS la concentración aún fue significativamente más alta con respecto al control. No obstante que los niveles de ROS se incrementaron con la adición de ambos PFCs, no

aumentó significativamente la capacitación *in vitro*. Aunque los ROS son necesarios para las funciones de los espermatozoides, algunos autores han demostrado que los espermatozoides de cerdo son extremadamente sensibles a ellos, y esto se ha relacionado con alteraciones en la motilidad, integridad del acrosoma, peroxidación de lípidos y daño al ADN (Awda *et al.*, 2009, Feng *et al.*, 2020, Kothari *et al.*, 2010). Es posible que los PFCs hayan dañado la membrana mitocondrial provocando un aumento de los niveles intracelulares de ROS (Cocuzza *et al.*, 2007), lo que afectó a la fosforilación de proteínas, al ADN y en general al proceso de capacitación en los espermatozoides de este estudio.

## 11 CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que PFOS y PFHxS dañan a los espermatozoides por diferentes vías, PFOS requirió de una concentración letal menor para llegar a la CL<sub>50</sub>, PFHxS causa mayor producción de ROS y daño al ADN. A continuación, se detallan los resultados más sobresalientes.

### 11.1 PFOS

- Causó mortalidad espermática, la CL<sub>50</sub> fue de 460.55 µM.
- Disminuyó significativamente la capacitación espermática con todas las fracciones subletales utilizadas.
- Disminuyó significativamente la RAe desde ½ CL<sub>50</sub>.
- Aunque la fosforilación de tirosinas no presentó diferencias significativas en intensidad de fluorescencia entre los grupos tratados y los controles, los patrones de fluorescencia en microscopía fueron diferentes. Disminuyeron los espermatozoides con fluorescencia en la cabeza, con el patrón de fluorescencia en la zona ecuatorial y el conjunto de zona ecuatorial más zona acrosomal.
- Aumentaron casi al doble las ROS desde los 30 minutos de exposición, aunque a las 2 horas las diferencias ya no fueron significativas.
- Los espermatozoides sufrieron más daño en el ADN en presencia de PFOS.

### 11.2 PFHxS

- Causó mortalidad espermática, la CL<sub>50</sub> fue de 1930.60 µM.
- No afectó significativamente la capacitación espermática.

- Aumentó significativamente la RA desde  $1/5$  CL<sub>50</sub>.
- Los datos de citometría no indicaron modificación en la intensidad de fluorescencia debida a fosforilación de proteínas, sin embargo, disminuyeron los patrones de fluorescencia en el acrosoma y del conjunto acrosoma y zona ecuatorial, y aumentó significativamente la fosforilación del patrón de zona ecuatorial.
- Las ROS aumentaron casi 2.5 veces desde los 30 minutos de exposición, y permanecieron más altas hasta las 2 horas.
- El ADN espermático se dañó a más del doble con la presencia del PFHxS.

## 12 PERSPECTIVAS

Como muestran los resultados de este trabajo, PFOS y PFHxS causan daños en el espermatozoide. Para seguir con la investigación se propone:

- Evaluar cuál es la alteración que provoca el incremento en ROS, mitocondrial o de otro tipo.
- Analizar otros daños causados por los niveles elevados de ROS, como la peroxidación lipídica.
- Analizar si los PFCs están involucrados con la alteración del transporte de calcio a nivel de los canales de calcio.
- Evaluar si los PFCs dañan otras funciones como la polimerización de actina.
- Diseñar un modelo que permita la fecundación *in vitro* y analizar posibles alteraciones *in vivo* causadas por la exposición a los PFCs.
- Diseñar metodologías adecuadas para evaluar la aglutinación espermática.

## 13 BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, A., MULGUND, A., ALSHAHRANI, S., ASSIDI, M., ABUZENADAH, A. M., SHARMA, R. & SABANEKH, E. 2014. Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia. *Reprod Biol Endocrinol*. England.
- AGARWAL, A., MULGUND, A., HAMADA, A. & CHYATTE, M. R. 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. England.
- AGARWAL, A., SALEH, R. A. & BEDAIWY, M. A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. United States.
- AHRENS, A. & TRAAS, T. P. 2007. Environmental exposure scenarios: development, challenges and possible solutions. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. United States.
- AITKEN, R. J., JONES, K. T. & ROBERTSON, S. A. 2012. Reactive oxygen species and sperm function-in sickness and in health. *Journal of Andrology*, 33, 1096-1106.
- ALKMIN, D. V., MARTINEZ-ALBORCIA, M. J., PARRILLA, I., VAZQUEZ, J. M., MARTINEZ, E. A. & ROCA, J. 2013. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology*, 79, 1294-300.
- ANIFANDIS, G., KATSANAKI, K., LAGODONTI, G., MESSINI, C., SIMOPOULOU, M., DAFIPOULOS, K. & DAPONTE, A. 2018. The Effect of Glyphosate on Human Sperm Motility and Sperm DNA Fragmentation. *Int J Environ Res Public Health*, 15.
- ARENAS-RÍOS, E., RODRÍGUEZ-TOBÓN, A., TRINIDAD, B. P. L., SANDOVAL, F. M. R., TOBÓN, E. R., JIMENEZ-SALAZAR, J. E. & LEÓN-GALVÁN, M. A. 2014. Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana de ciencias*, 1, 73.
- ATSDR 2018. Toxicological Profile for Perfluoroalkyls (Draft for Public Comment).

- AWDA, B. J., MACKENZIE-BELL, M. & BUHR, M. M. 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of Reproduction*, 81, 553-561.
- BANSAL, A. K. & BILASPURI, G. S. 2010. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 2010.
- BARRE-SINOUSSE, F. & MONTAGUTELLI, X. 2015. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Sci OA*, 1, FSO63.
- BEESEON, S., GENUIS, S. J., BENSKIN, J. P. & MARTIN, J. W. 2012. Exceptionally high serum concentrations of perfluorohexanesulfonate in a Canadian family are linked to home carpet treatment applications. *Environ Sci Technol*, 46, 12960-7.
- 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*, 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*. United States.
- BONILLA, E. & DEL MAZO, J. 2010. Deregulation of the Sod1 and Nd1 genes in mouse fetal oocytes exposed to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). *Reprod Toxicol*. United States.
- CALAFAT, A. M., WONG, L. Y., KUKLENYIK, Z., REIDY, J. A. & NEEDHAM, L. L. 2007. Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environ Health Perspect*, 115, 1596-602.
- CAMBIASSO, M. Y., GALOTTO, C., SANCHEZ, M. C., FONTANA, V. A., PIÑEIRO, L., ROMANATO, M. & CALVO, J. C. 2018. El espermatozoide: algo más que un paquete de lujo para entregar DNA.

- CHEN, N., LI, J., LI, D., YANG, Y. & HE, D. 2014. Chronic exposure to perfluorooctane sulfonate induces behavior defects and neurotoxicity through oxidative damages, in vivo and in vitro. *PLoS One*. United States.
- CHIANG, C., MAHALINGAM, S. & FLAWS, J. A. 2017. Environmental Contaminants Affecting Fertility and Somatic Health. *Semin Reprod Med*, 35, 241-249.
- COCUZZA, M., SIKKA, S. C., ATHAYDE, K. S. & AGARWAL, A. 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol*. Brazil.
- COLE, L. & KRAMER, P. R. 2016. Chapter 3.10 - Fertilization Implantation and Human Pregnancy. In: COLE, L. & KRAMER, P. R. (eds.) *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. Boston: Academic Press.
- CONCAWE 2016. Environmental Fate and Effects of Poly – and Perfluoroalkyl Substances (PFAS), Report 8/16. Brussels, Belgium.
- 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, 209-17.
- CORRA, L., LENARDÓN, A., CARRERO, D., MONTI, V. & FIGLIOLO, C. 2009. Herramienta de capacitación para el manejo responsable de plaguicidas y sus envases: efectos sobre la salud y prevención de la exposición. *Herramienta de capacitación para el manejo responsable de plaguicidas y sus envases: efectos sobre la salud y prevención de la exposición*. Organización Panamericana de la Salud.
- CROOM, E. 2012. Chapter Three - Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. In: HODGSON, E. (ed.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press.
- DED, L., DOSTALOVA, P., ZATECKA, E., DOROSH, A., KOMRSKOVA, K. & PEKNICOVA, J. 2019. Fluorescent analysis of boar sperm capacitation process in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. England.

- DIERCKS, A. K., BURGERS, H. F., SCHWAB, A. & SCHENKEL, J. 2012. Improved assessment of frozen/thawed mouse spermatozoa using fluorescence microscopy. *J Vet Sci. Korea (South)*.
- DOBRZYNSKA, M. M. 2016. Phthalates - widespread occurrence and the effect on male gametes. Part 2. The effects of phthalates on male gametes and on the offspring. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 67, 209-21.
- DONOHUE, J. M. 2014. Health effects document for Perfluorooctane Sulfonate (PFOS). *In*: AGENCY, U. S. E. P. (ed.). Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.
- DORMAN, F. L. & REINER, E. J. 2012. Chapter 28 - Emerging and Persistent Environmental Compound Analysis. *In*: POOLE, C. F. (ed.) *Gas Chromatography*. Amsterdam: Elsevier.
- DURUTOVIC, O., LALIC, N., MILENKOVIC-PETRONIC, D., BOJANIC, N., DJORDJEVIC, D., MILOJEVIC, B., LADJEVIC, N., MIMIC, A., TULIC, L., DZAMIC, Z. & MICIC, S. 2013. The correlation of biochemical and morphologic parameters in the assessment of sperm maturity. *Urology*, 82, 1296-9.
- EFSA 2008. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. . *EFSA Journal*, 653.
- ERIKSEN, K. T., RAASCHOU-NIELSEN, O., SORENSEN, M., ROURSGAARD, M., LOFT, S. & MOLLER, P. 2010. Genotoxic potential of the perfluorinated chemicals PFOA, PFOS, PFBS, PFNA and PFHxA in human HepG2 cells. *Mutat Res. Netherlands*.
- FABREGA, A., PUIGMULE, M., YESTE, M., CASAS, I., BONET, S. & PINART, E. 2011. Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology*. United States.

- FENG, C., ZHU, Z., BAI, W., LI, R., ZHENG, Y., TIAN, X., WU, LU, H., WANG, Y. & ZENG, W. 2020. Proline Protects Boar Sperm against Oxidative Stress through Proline Dehydrogenase-Mediated Metabolism and the Amine Structure of Pyrrolidine. *Animals (Basel)*, 10.
- FLESCH, F. M. & GADELLA, B. M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*, 1469, 197-235.
- FLESCH, F. M., WIJNAND, E., VAN DE LEST, C. H., COLENBRANDER, B., VAN GOLDE, L. M. & GADELLA, B. M. 2001. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Mol Reprod Dev*. United States.
- FLORENTIN, A., DEBLONDE, T., DIGUIO, N., HAUTEMANIERE, A. & HARTEMANN, P. 2011. Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: cytotoxicity but no genotoxicity? *Int J Hyg Environ Health*. Germany.
- FLORMAN, H. M., ARNOULT, C., KAZAM, I. G., LI, C. & O'TOOLE, C. M. 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod*, 59, 12-6.
- FORD, W. C. 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 10, 387-99.
- FORESTA, C., TESCARI, S. & DI NISIO, A. 2018. Impact of perfluorochemicals on human health and reproduction: a male's perspective. *J Endocrinol Invest*, 41, 639-645.
- FRASER, L. R. & HEROD, J. E. 1990. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *J Reprod Fertil*, 88, 611-21.
- FROMME, H., TITTELMIER, S. A., VOLKEL, W., WILHELM, M. & TWARDELLA, D. 2009. Perfluorinated compounds--exposure assessment for the general population in Western countries. *Int J Hyg Environ Health*, 212, 239-70.

- GAO, Y., CHEN, H., XIAO, X., LUI, W. Y., LEE, W. M., MRUK, D. D. & CHENG, C. Y. 2017. Perfluorooctanesulfonate (PFOS)-induced Sertoli cell injury through a disruption of F-actin and microtubule organization is mediated by Akt1/2. *Sci Rep*. England.
- GARNER, D. L. & HAFEZ, E. S. E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Farm Animals*.
- GUERRANTI, C., ANCORA, S., BIANCHI, N., PERRA, G., FANELLO, E. L., CORSOLINI, S., FOSSI, M. C. & FOCARDI, S. E. 2013. Perfluorinated compounds in blood of *Caretta caretta* from the Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull*, 73, 98-101.
- GUTHRIE, H. D. & WELCH, G. R. 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci*. United States.
- GUTHRIE, H. D. & WELCH, G. R. 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 78, 1700-8.
- HAFEZ, E. S. E. Y. H., B. 2002. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*, México, D. F. , McGraw-Hill Interamericana.
- HARIPARSAD, N., SANE, R. S., STROM, S. C. & DESAI, P. B. 2006. In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicol In Vitro*. England.
- HICKMAN, D. L., JOHNSON, J., VEMULAPALLI, T. H., CRISLER, J. R. & SHEPHERD, R. 2017. Commonly Used Animal Models. *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students*, 117-175.
- HIDALGO ORDÓÑEZ, C. O., TAMARGO MIGUEL, C. & DÍEZ MONFORTE, C. 2005. Análisis del semen bovino. *Tecn Agro*, 2, 39-43.
- IOMMIELLO, V. M., ALBANI, E., DI ROSA, A., MARRAS, A., MENDUNI, F., MORREALE, G., LEVI, S. L., PISANO, B. & LEVI-SETTI, P. E. 2015. Ejaculate oxidative stress is

related with sperm DNA fragmentation and round cells. *Int J Endocrinol*, 2015, 321901.

JIMENEZ, I., FIERRO, R., GONZALEZ-MARQUEZ, H., MENDOZA-HERNANDEZ, G., ROMO, S. & BETANCOURT, M. 2006. Carbohydrate affinity chromatography indicates that arylsulfatase-A from capacitated boar sperm has mannose and N-acetylglucosamine/sialic acid residues. *Arch Androl*. England.

JIMENEZ, I., GONZALEZ-MARQUEZ, H., ORTIZ, R., HERRERA, J. A., GARCII, A., BETANCOURT, M. & FIERRO, R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*. United States.

JOENSEN, U. N., BOSSI, R., LEFFERS, H., JENSEN, A. A., SKAKKEBAEK, N. E. & JORGENSEN, N. 2009. Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect*, 117, 923-7.

JONES, R., JAMES, P. S., OXLEY, D., COADWELL, J., SUZUKI-TOYOTA, F. & HOWES, E. A. 2008. The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. *Biol Reprod*. United States.

KATO, K., WONG, L. Y., BASDEN, B. J. & CALAFAT, A. M. 2013. Effect of temperature and duration of storage on the stability of polyfluoroalkyl chemicals in human serum. *Chemosphere*, 91, 115-7.

KATZ, D. J., TELOKEN, P. & SHOSHANY, O. 2017. Male infertility - The other side of the equation. *Aust Fam Physician*, 46, 641-646.

KEMPER, R. A. & JEPSON, G. W. Pharmacokinetics of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *Toxicological Sciences*, 2003. OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND, 148-148.

KHANSARI, M. R., YOUSEFSANI, B. S., KOBARFARD, F., FAIZI, M. & POURAHMAD, J. 2017. In vitro toxicity of perfluorooctane sulfonate on rat liver hepatocytes: probability

of destructive binding to CYP 2E1 and involvement of cellular proteolysis. *Environ Sci Pollut Res Int.* Germany.

KOETER, H. B. 1993. Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of in vitro studies. *Reprod Toxicol*, 7 Suppl 1, 117-23.

KONCA, K., LANKOFF, A., BANASIK, A., LISOWSKA, H., KUSZEWSKI, T., GOZDZ, S., KOZA, Z. & WOJCIK, A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res.* Netherlands.

KOPF, G. S. 2001. Acrosome. *In*: BRENNER, S. & MILLER, J. H. (eds.) *Encyclopedia of Genetics*. New York: Academic Press.

KOTHARI, S., THOMPSON, A., AGARWAL, A. & DU PLESSIS, S. S. 2010. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*, 48, 425-35.

KUZMUK, K. N. & SCHOOK, L. B. 2011. Pigs as a model for biomedical sciences. *The genetics of the pig*, 2, 426-444.

LAMB, D. J. 1993. Growth factors and testicular development. *J Urol*, 150, 583-92.

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.* United States.

LAU, C., STRYNAR, M. J., LINDSTROM, A. B., HANSON, R. G., THIBODEAUX, J. R. & BARTON, H. A. 2005. Pharmacokinetic evaluation of perfluorooctanoic acid in the mouse. *Toxicologist*, 84, 252.

LEE, H. G., LEE, Y. J. & YANG, J. H. 2012. Perfluorooctane sulfonate induces apoptosis of cerebellar granule cells via a ROS-dependent protein kinase C signaling pathway. *Neurotoxicology*. Netherlands.

- LEE, I. & VIBERG, H. 2013. A single neonatal exposure to perfluorohexane sulfonate (PFHxS) affects the levels of important neuroproteins in the developing mouse brain. *NeuroToxicology*, 37, 190-196.
- LEE, Y. J. 2018. Potential health effects of emerging environmental contaminants perfluoroalkyl compounds. *Yeungnam Univ J Med*. Korea (South).
- LEE, Y. J., CHOI, S. Y. & YANG, J. H. 2014. PFHxS induces apoptosis of neuronal cells via ERK1/2-mediated pathway. *Chemosphere*, 94, 121-7.
- LEE, Y. J., KIM, M. K., BAE, J. & YANG, J. H. 2013. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in Korea. *Chemosphere*, 90, 1603-9.
- 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, 2099-104.
- 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, 5335-41.
- LIM, T. C., WANG, B., HUANG, J., DENG, S. & YU, G. 2011. Emission Inventory for PFOS in China: Review of Past Methodologies and Suggestions. *TheScientificWorldJOURNAL*, 11, 868156.
- LINDSTROM, A. B., STRYNAR, M. J. & LIBELO, E. L. 2011. Polyfluorinated compounds: past, present, and future. *Environ Sci Technol*, 45, 7954-61.
- LOUIS, G. M., CHEN, Z., SCHISTERMAN, E. F., KIM, S., SWEENEY, A. M., SUNDARAM, R., LYNCH, C. D., GORE-LANGTON, R. E. & BARR, D. B. 2015. Perfluorochemicals and human semen quality: the LIFE study. *Environ Health Perspect*, 123, 57-63.

- LUCZAJ, W. & SKRZYDLEWSKA, E. 2003. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett*, 8, 391-413.
- LUNNEY, J. K. 2007. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*, 3, 179-84.
- MARAVILLA-GALVAN, R., FIERRO, R., GONZALEZ-MARQUEZ, H., GOMEZ-ARROYO, S., JIMENEZ, I. & BETANCOURT, M. 2009. Effects of atrazine and fenoxaprop-ethyl on capacitation and the acrosomal reaction in boar sperm. *Int J Toxicol*. United States.
- 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. *International Journal of Toxicology*, 28, 24-32.
- MORAN, C. J., RAMESH, A., BRAMA, P. A., O'BYRNE, J. M., O'BRIEN, F. J. & LEVINGSTONE, T. J. 2016. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J Exp Orthop*. Germany.
- NAZ, R. K. & RAJESH, P. B. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol*. England.
- NEUBERT, D. 2002. Reproductive toxicology: The science today. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 22, 159-174.
- NEWSTED, J. & JONES, P. 2005. Surfactants, Perfluorinated. In: WEXLER, P. (ed.) *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*. New York: Elsevier.
- O'FLAHERTY, C. & MATSUSHITA-FOURNIER, D. 2017. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol Reprod*. United States.
- OLIAEI, F., KRIENS, D., WEBER, R. & WATSON, A. 2013. PFOS and PFC releases and associated pollution from a PFC production plant in Minnesota (USA). *Environ Sci Pollut Res Int*, 20, 1977-92.

- OLIVERA, M., RUIZ, T., TARAZONA, A. & GIRALDO, C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19, 426-436.
- 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, 1298-305.
- OSEGUERA-LOPEZ, I., RUIZ-DIAZ, S., RAMOS-IBEAS, P. & PEREZ-CEREZALES, S. 2019. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. *Front Cell Dev Biol*, 7, 298.
- PAN, Y., QIN, H., LIU, W., ZHANG, Q., ZHENG, L., ZHOU, C. & QUAN, X. 2019. Effects of chlorinated polyfluoroalkyl ether sulfonate in comparison with perfluoroalkyl acids on gene profiles and stemness in human mesenchymal stem cells. *Chemosphere*, 237, 124402.
- PATTERSON, A. D., GONZALEZ, F. J. & IDLE, J. R. 2010. Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer. *Chem Res Toxicol*, 23, 851-60.
- 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, 386-92.
- PEREZ-CEREZALES, S., LAGUNA-BARRAZA, R., DE CASTRO, A. C., SANCHEZ-CALABUIG, M. J., CANO-OLIVA, E., DE CASTRO-PITA, F. J., MONTORO-BUILS, L., PERICUESTA, E., FERNANDEZ-GONZALEZ, R. & GUTIERREZ-ADAN, A. 2018. Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice. *Sci Rep*. England.
- PIMENTEL-PEÑALOZA, E. A., ORTIZ-MUÑIZ, A. R. & BREÑA-VALLE, M. 2006. *Tópicos de genética*, UAEM.

- QIU, L., QIAN, Y., LIU, Z., WANG, C., QU, J., WANG, X. & WANG, S. 2016. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) disrupts blood-testis barrier by down-regulating junction proteins via p38 MAPK/ATF2/MMP9 signaling pathway. *Toxicology*, 373, 1-12.
- QUIROZ, L. E. G. & BAHENA, D. B. C. 2008. Superóxido Dismutasa. *In*: KONIGSBERG, M. (ed.) *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*.
- RAJABI-TOUSTANI, R., AKTER, Q. S., ALMADALY, E. A., HOSHINO, Y., ADACHI, H., MUKOUJIMA, K. & MURASE, T. 2019. Methodological improvement of fluorescein isothiocyanate peanut agglutinin (FITC-PNA) acrosomal integrity staining for frozen-thawed Japanese Black bull spermatozoa. *J Vet Med Sci*, 81, 694-702.
- REINER, E. J., JOBST, K. J., MEGSON, D., DORMAN, F. L. & FOCANT, J.-F. 2014. Chapter 3 - Analytical Methodology of POPs. *In*: O'SULLIVAN, G. & SANDAU, C. (eds.) *Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants*. Amsterdam: Elsevier.
- RODRIGUEZ-GIL, J. E. & BONET, S. 2016. Current knowledge on boar sperm metabolism: Comparison with other mammalian species. *Theriogenology*, 85, 4-11.
- ROLDAN, E. R. S. 2018. Male Fertility Overview. *In*: SKINNER, M. K. (ed.) *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Oxford: Academic Press.
- ROLDÁN REYES, E. 2016. *Introducción a la toxicología*, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.
- RUIZ-DIAZ, S., GRANDE-PEREZ, S., ARCE-LOPEZ, S., TAMARGO, C., OLEGARIO HIDALGO, C. & PEREZ-CEREZALES, S. 2020. Changes in the Cellular Distribution of Tyrosine Phosphorylation and Its Relationship with the Acrosomal Exocytosis and Plasma Membrane Integrity during In Vitro Capacitation of Frozen/Thawed Bull Spermatozoa. *Int J Mol Sci*, 21.
- RYLANDER, C., PHI, D. T., ODLAND, J. O. & SANDANGER, T. M. 2009. Perfluorinated compounds in delivering women from south central Vietnam. *J Environ Monit*, 11, 2002-8.

- SCHOOK, L. B. 2007. The porcine genome initiative: Implications for digestive physiology. *Livestock Science*, 108, 6-12.
- SELVARAJU, V., BASKARAN, S., AGARWAL, A. & HENKEL, R. 2021. Environmental contaminants and male infertility: Effects and mechanisms. *Andrologia*, 53, e13646.
- SHI, Y., CAI, Y. & JIANG, G. 2012. 3.31 - Sample Pretreatment Techniques for Perfluorinated Compounds. In: PAWLISZYN, J. (ed.) *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Oxford: Academic Press.
- SHI, Z., ZHANG, H., LIU, Y., XU, M. & DAI, J. 2007. Alterations in gene expression and testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicol Sci*. United States.
- SIBINSKI, L. J., ALLEN, J. L. & ERICKSON, E. E. 1987. Two year oral (diet) toxicity/carcinogenicity study of fluorochemical FC-143 in rats. *3M Company/Riker Exp No 0281CR0012 M*, 3.
- SLOTKIN, T. A., MACKILLOP, E. A., MELNICK, R. L., THAYER, K. A. & SEIDLER, F. J. 2008. Developmental neurotoxicity of perfluorinated chemicals modeled in vitro. *Environ Health Perspect*, 116, 716-22.
- STAHL, T., MATTERN, D. & BRUNN, H. 2011. Toxicology of perfluorinated compounds. *Environmental Sciences Europe*, 23, 38.
- SUAREZ, S. S. & HO, H. C. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim*. Germany.
- SUN, Q. Y. & NAGAI, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev*, 49, 347-59.
- SUTOVSKY, P. 2018. Pig Overview. In: SKINNER, M. K. (ed.) *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Oxford: Academic Press.

- TANG, L. H., WONG, I. Y. & LO, A. C. 2017. Animal Models of Diabetic Retinopathy (Part 1). *Experimental Animal Models of Human Diseases-An Effective Therapeutic Strategy*. IntechOpen.
- TAO, L., MA, J., KUNISUE, T., LIBELO, E. L., TANABE, S. & KANNAN, K. 2008. Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environ Sci Technol*, 42, 8597-602.
- TARDIF, S., DUBE, C., CHEVALIER, S. & BAILEY, J. L. 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod*, 65, 784-92.
- THOMPSON, S. K., KUTCHY, N. A., KWOK, S., ROSYADA, Z. N. A., IMUMORIN, I. G., PURWANTARA, B. & MEMILI, E. 2018. Review: Sperm: Comparative morphology and function related to altered reproductive strategies and fertility in mammals. *The Professional Animal Scientist*, 34, 558-565.
- TOFT, G., JONSSON, B. A., LINDH, C. H., GIWERCMAN, A., SPANO, M., HEEDERIK, D., LENTERS, V., VERMEULEN, R., RYLANDER, L., PEDERSEN, H. S., LUDWICKI, J. K., ZVIEZDAI, V. & BONDE, J. P. 2012. Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in Arctic and European populations. *Hum Reprod*. England.
- TROJANOWICZ, M., BARTOSIEWICZ, I., BOJANOWSKA-CZAJKA, A., SZREDER, T., BOBROWSKI, K., NAŁĘCZ-JAWECKI, G., MĘCZYŃSKA-WIELGOSZ, S. & NICHIPOR, H. 2020. Application of ionizing radiation in decomposition of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 379, 122303.
- TROJANOWICZ, M., BOJANOWSKA-CZAJKA, A., BARTOSIEWICZ, I. & KULISA, K. 2018. Advanced Oxidation/Reduction Processes treatment for aqueous perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctanesulfonate (PFOS) – A review of recent advances. *Chemical Engineering Journal*, 336, 170-199.

- TUMBLESON, M. E. & SCHOOK, L. B. 1996. *Advances in swine in biomedical research*, Springer Science & Business Media.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME 2019. The Evolving Chemicals Economy: Status And Trends Relevant For Sustainability - Global Chemicals Outlook II Part I.
- VAZQUEZ-LEVIN, M. H. & VERÓN, G. L. 2018. Laboratory Evaluation of Sperm–Ovum Interaction. *In*: SKINNER, M. K. (ed.) *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Oxford: Academic Press.
- VILLEGAS, J., KEHR, K., SOTO, L., HENKEL, R., MISKA, W. & SANCHEZ, R. 2003. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia*. Germany.
- VISCONTI, P. E., GALANTINO-HOMER, H., NING, X., MOORE, G. D., VALENZUELA, J. P., JORGEZ, C. J., ALVAREZ, J. G. & KOPF, G. S. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem*, 274, 3235-42.
- WARD, C. R. & STOREY, B. T. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental Biology*, 104, 287-296.
- WASSARMAN, P. M. 2001. Fertilization, Mammalian. *In*: BRENNER, S. & MILLER, J. H. (eds.) *Encyclopedia of Genetics*. New York: Academic Press.
- WORLEY, R. R., MOORE, S. M., TIERNEY, B. C., YE, X., CALAFAT, A. M., CAMPBELL, S., WOULDNEH, M. B. & FISHER, J. 2017. Per- and polyfluoroalkyl substances in human serum and urine samples from a residentially exposed community. *Environ Int*, 106, 135-143.

- XIA, J. & NIU, C. 2017. Acute toxicity effects of perfluorooctane sulfonate on sperm vitality, kinematics and fertilization success in zebrafish. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35, 723-728.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*, 1, 189-317.
- YOSHIDA, M., ISHIZAKI, Y. & KAWAGISHI, H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil*, 88, 1-8.
- ZEGERS-HOCHSCHILD, F., ADAMSON, G. D., DYER, S., RACOWSKY, C., DE MOUZON, J., SOKOL, R., RIENZI, L., SUNDE, A., SCHMIDT, L., COOKE, I. D., SIMPSON, J. L. & VAN DER POEL, S. 2017. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*, 108, 393-406.
- ZENG, Y., CLARK, E. N. & FLORMAN, H. M. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol*. United States.
- ZHANG, L., LIU, J., HU, J., LIU, C., GUO, W., WANG, Q. & WANG, H. 2012. The inventory of sources, environmental releases and risk assessment for perfluorooctane sulfonate in China. *Environ Pollut*. England.
- ZHANG, X., CUI, W., WANG, K., CHEN, R., CHEN, M., LAN, K., WEI, Y., PAN, C. & LAN, X. 2020. Chlorpyrifos inhibits sperm maturation and induces a decrease in mouse male fertility. *Environ Res*, 188, 109785.

## 14 ANEXO

Durante el desarrollo de esta tesis se observaron alteraciones importantes en aglutinación y alteración en el movimiento espermático, principalmente causados por PFOS. Existen algunos factores por los cuales no fue posible determinar la forma correcta de medir estos parámetros. Por ejemplo, para medir los aglutinados, se observó que eran más grandes que el campo visual del microscopio y la motilidad también es un parámetro difícil de medir con la presencia de ambos PFCs, ya que 1) los aglutinados interfieren con los espermatozoides libres cuando se intentan realizar las mediciones por medio de CASA. 2) La adición de los PFCs parece tener un efecto de adhesión de los espermatozoides a las superficies donde se colocan (vidrio, plásticos, etc.), evitando el libre desplazamiento necesario para la medición por CASA.

Para estas mediciones y hasta que se pueda establecer una forma óptima de documentar estos resultados, se adoptó una forma de medición arbitraria para la aglutinación y motilidad. Teniendo en cuenta esto puntos, se observó que PFOS inhibe la motilidad espermática progresiva, y ocasiona un incremento en la aglutinación; al adicionar dosis crecientes de este compuesto en el MDC resultó en un movimiento progresivo lento y/o la pérdida de movimiento (Tabla 5 y Fig. 16).

Tabla 5. Efecto de los PFOS sobre la motilidad y aglutinación *in vivo* de espermatozoides de cerdo.

| Tratamiento         | Concentración (μM) | Motilidad (%) | Vigorosidad | Aglutinación |
|---------------------|--------------------|---------------|-------------|--------------|
| TALP-HEPES (Blanco) |                    | +++           | +++         | +            |
| TALP-HEPES + DMSO   |                    | +++           | +++         | ++           |
| MDC+ PFOS           | 1000               | ++            | ++          | ++           |
|                     | 2000               | +             | +           | ++++         |
|                     | 3000               | +             | +           | ++++         |

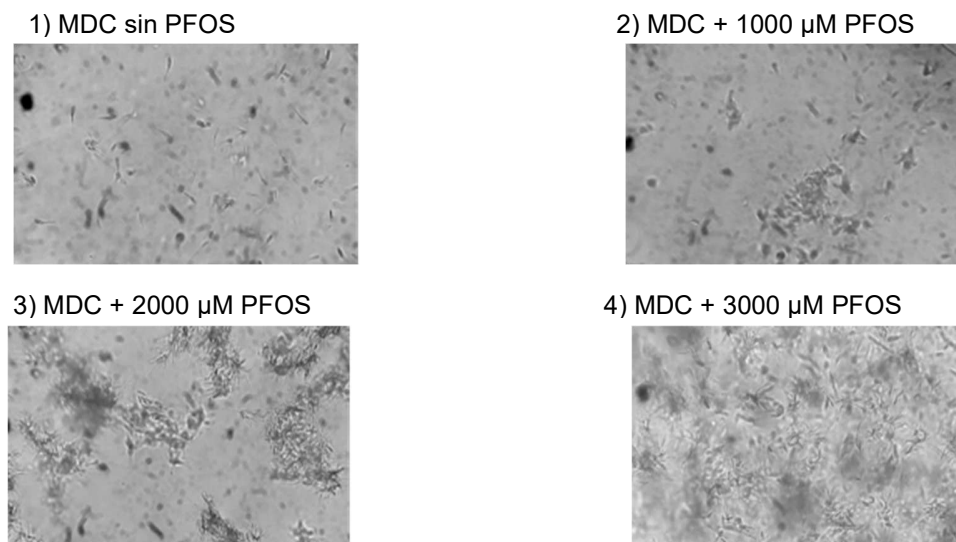


Figura 16. Micrografía electrónica en aumento 40X que muestra el perfil de aglutinación observado en los espermatozoides sometidos a las diferentes concentraciones de PFOS; destacándose la motilidad no progresiva bajo la mayor concentración de PFOS.

También se observó un incremento en la aglutinación con las fracciones subletales de PFOS, la aglutinación de los espermatozoides aumentaba conforme las fracciones incrementaban (Fig. 17). La motilidad, que era buena en las muestras control disminuyó, ante las concentraciones crecientes de PFOS, efecto no observado con la adición de las fracciones subletales de PFHxS.

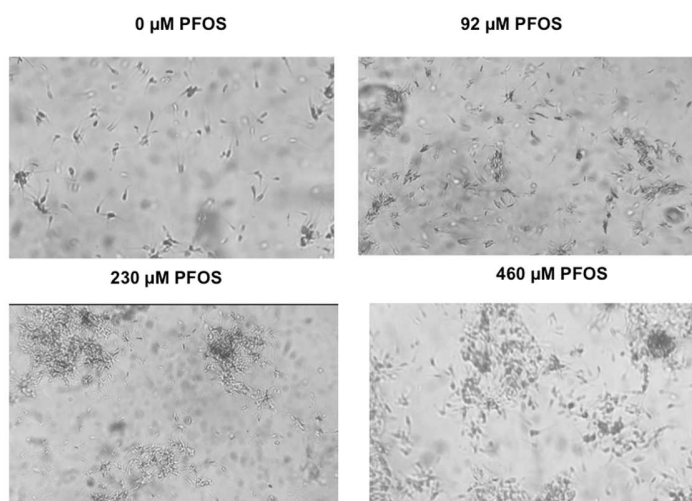


Figura 17. Micrografía electrónica en aumento 40X que muestra el perfil de aglutinación observado en los espermatozoides sometidos a las fracciones y a la concentración letal media de PFOS.

# 15 PRODUCTOS DERIVADOS DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

## 15.1 Artículos de investigación



animals



Article

### The Presence of D-Penicillamine during the In Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa Prolongs Hyperactive-Like Motility and Allows for Sperm Selection by Thermotaxis

Sara Ruiz-Díaz <sup>1,2,†</sup>, Ivan Oseguera-López <sup>3,†</sup>, David De La Cuesta-Díaz <sup>1</sup>, Belén García-López <sup>1</sup>, Consuelo Serres <sup>4</sup>, María José Sánchez-Calabuig <sup>4</sup>, Alfonso Gutiérrez-Adán <sup>1,\*</sup> and Serafin Perez-Cereales <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Reproduction, National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA), 28040 Madrid, Spain; sruizd@clincatambre.com (S.R.-D.); davedled@gmail.com (D.D.L.C.-D.); belen.garcia@inia.es (B.G.-L.); serafin.perez@inia.es (S.P.-C.)

<sup>2</sup> Mistral Fertility Clinics S.L., Clínica Tambre, 28002 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 09340, Mexico; ivanoslo@yahoo.com.mx

<sup>4</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain; cserres@ucm.es (C.S.); msanch26@ucm.es (M.J.S.-C.)

\* Correspondence: agutierr@inia.es

† These authors contributed equally.

Received: 9 July 2020; Accepted: 18 August 2020; Published: 21 August 2020



**Simple Summary:** Capacitation of stallion semen in vitro is still a suboptimal procedure. The main objective of this study was the use of thermotaxis as a novel method for sperm selection and determining the most adequate media for maintaining frozen/thawed horse sperm longevity in vitro. Our results show that the most common media (Whitten's) used in this species is not the best for capacitating the semen in terms of hyperactive-like motility, and tyrosine phosphorylation being synthetic human tubal fluid supplemented with D-penicillamine is the most adequate in preserving these parameters during 180 min of incubation. Therefore, this media (with and without D-penicillamine) was chosen for performing thermotaxis. The selection conditions were a gradient of 3 °C of difference (35–38 °C) for 1 h. The results revealed that the selected fraction showed higher levels of tyrosine phosphorylation in the whole flagellum and lower levels of DNA fragmentation when compared to the unselected fraction (kept at 37 °C) when human tubal fluid with D-penicillamine was used. These results are promising for improving the in vitro embryo production rates in these species by improving the sperm selection methodology.

**Abstract:** Assisted reproductive technologies (ARTs) in the horse still yield suboptimal results in terms of pregnancy rates. One of the reasons for this is the lack of optimal conditions for the sperm capacitation in vitro. This study assesses the use of synthetic human tubal fluid (HTF) supplemented with D-penicillamine (HTF + PEN) for the in vitro capacitation of frozen/thawed stallion spermatozoa by examining capacitation-related events over 180 min of incubation. Besides these events, we explored the in vitro capacity of the spermatozoa to migrate by thermotaxis and give rise to a population of high-quality spermatozoa. We found that HTF induced higher levels of hyperactive-like motility and protein tyrosine phosphorylation (PTP) compared to the use of a medium commonly used in this species (Whitten's). Also, HTF + PEN was able to maintain this hyperactive-like motility, otherwise lost in the absence of PEN, for 180 min, and also allowed for sperm selection by thermotaxis in vitro. Remarkably, the selected fraction was enriched in spermatozoa showing PTP along the whole flagellum and lower levels of DNA fragmentation when compared to the unselected fraction (38% ± 11% vs 4.4% ± 1.1% and 4.2% ± 0.4% vs 11% ± 2% respectively,

## Article

# Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) Alters Protein Phosphorylation, Increase ROS Levels and DNA Fragmentation during In Vitro Capacitation of Boar Spermatozoa

Iván Oseguera-López <sup>1</sup>, Serafín Pérez-Cereales <sup>2,†</sup>, Paola Berenice Ortiz-Sánchez <sup>1</sup>, Oscar Mondragon-Payne <sup>3</sup>, Raúl Sánchez-Sánchez <sup>2</sup>, Irma Jiménez-Morales <sup>4</sup>, Reyna Fierro <sup>4</sup> and Humberto González-Márquez <sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City 09340, Mexico; ivanoslo@yahoo.com.mx (I.O.-L.); biobere.fis@gmail.com (P.B.O.-S.)

<sup>2</sup> Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 28040 Madrid, Spain; perez.serafin@inia.es (S.P.-C.); raulss@inia.es (R.S.-S.)

<sup>3</sup> Maestría en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City 09340, Mexico; oscar\_payne@hotmail.com

<sup>4</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico; jimi@xanum.uam.mx (I.J.-M.); reyna@xanum.uam.mx (R.F.)

\* Correspondence: hgm@xanum.uam.mx; Tel.: +52-55-5804-6557

† Deceased.

Received: 5 October 2020; Accepted: 15 October 2020; Published: 21 October 2020



**Simple Summary:** Perfluorinated compounds are synthetic chemicals, with a wide variety of applications like firefighting foams, food packaging, additives in paper and fabrics to avoid dyes. Perfluorooctane sulfonate and perfluorohexane sulfonate are globally distributed, and contaminates air, water, food, and dust, have toxic effects and bioaccumulate. Significant levels of these compounds have found in blood serum, breast milk, and semen of occupationally exposed and unexposed people, as well as in blood serum and organs of the domestic, farm, and wild animals. The present study seeks to analyze the toxic effects and possible alterations caused by the presence of these compounds in boar sperm during the in vitro capacitation, due to their toxicity, worldwide distribution, and lack of information in spermatozoa physiology during pre-fertilization processes.

**Abstract:** Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorohexane sulfonate (PFHxS) are toxic and bioaccumulative, included in the Stockholm Convention's list as persistent organic pollutants. Due to their toxicity, worldwide distribution, and lack of information in spermatozoa physiology during pre-fertilization processes, the present study seeks to analyze the toxic effects and possible alterations caused by the presence of these compounds in boar sperm during the in vitro capacitation. The spermatozoa capacitation was performed in supplemented TALP-Hepes media and mean lethal concentration values of 460.55  $\mu$ M for PFOS, and 1930.60  $\mu$ M for PFHxS were obtained. Results by chlortetracycline staining showed that intracellular  $Ca^{2+}$  patterns bound to membrane proteins were scarcely affected by PFOS. The spontaneous acrosome reaction determined by FITC-PNA was significantly reduced by PFOS and slightly increased by PFHxS. Both toxic compounds significantly alter the normal capacitation process from 30 min of exposure. An increase in ROS production was observed by flow cytometry and considerable DNA fragmentation by the comet assay. The immunocytochemistry showed a decrease of tyrosine phosphorylation in proteins of the equatorial and acrosomal zone of the spermatozoa head. In conclusion, PFOS and PFHxS have toxic effects on the sperm, causing mortality and altering vital parameters for proper sperm capacitation.

## 15.2 Artículo de revisión



# Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes

Iván Oseguera-López<sup>1\*</sup>, Sara Ruiz-Díaz<sup>2,3†</sup>, Priscila Ramos-Ibeas<sup>3</sup> and Serafin Pérez-Cereales<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup> Mistral Fertility Clinics S.L., Clínica Tambo, Madrid, Spain, <sup>3</sup> Department of Animal Reproduction, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Zhibing Zhang,  
Virginia Commonwealth University,  
United States

### Reviewed by:

Hongmin Qin,  
Texas A&M University, United States  
Fan Jin,  
Zhejiang University, China

### \*Correspondence:

Serafin Pérez-Cereales  
perez.serafin@inia.es;  
s.perez.cereales@gmail.com

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cell Growth and Division,  
a section of the journal  
Frontiers in Cell and Developmental  
Biology

Received: 28 June 2019

Accepted: 07 November 2019

Published: 29 November 2019

### Citation:

Oseguera-López I, Ruiz-Díaz S,  
Ramos-Ibeas P and  
Pérez-Cereales S (2019) Novel  
Techniques of Sperm Selection  
for Improving IVF and ICSI Outcomes.  
Front. Cell Dev. Biol. 7:298.  
doi: 10.3389/fcell.2019.00298

Almost 50% of the infertility cases are due to male factors. Assisted reproductive technologies (ARTs) allow to overcome the incapacity of these patients' spermatozoa to fertilize the oocyte and produce a viable and healthy offspring, but the efficiency of the different techniques has still the potential to improve. According to the latest reports of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) and the Centers for Disease Control and Prevention of the United States (CDC), the percentages of deliveries per ART cycle in 2014 and 2016 were 21 and 22%, respectively. Among the reasons for this relatively low efficiency, the quality of the spermatozoa has been pointed out as critical, and the presence of high percentages of DNA-damaged spermatozoa in patients' ejaculates is possibly one of the main factors reducing the ARTs outcomes. Thus, one of the main challenges in reproductive medicine is to ensure the highest quality of the spermatozoa used in ARTs, and specifically, in terms of genetic integrity. The latest techniques for the preparation and selection of human spermatozoa are herein discussed focusing on those proven to improve one or several of the following parameters: sperm genetic integrity, fertilization capacity, embryo production, and *in vitro* survival, as well as pregnancy and delivery rates following *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In addition, we discuss the potential of techniques developed in non-human mammals that could be further transferred to the clinic.

**Keywords:** sperm selection, ICSI, IVF, ARTs, sperm quality

## INTRODUCTION

### Current Efficiency of ARTs

According to the World Health Organization, infertility is defined as "a disease characterized by the failure to establish a clinical pregnancy after 12 months of regular, unprotected sexual intercourse or due to an impairment of a person's capacity to reproduce either as an individual or with his/her partner" (Zegers-Hochschild et al., 2017). Around 15–20% of couples within the reproductive age are infertile and in ~50% of the cases, the male factor is present. Furthermore, in 30–40% of cases, the male infertility is idiopathic (Katz et al., 2017). In order to overcome infertility, a number of clinical treatments have been successfully developed and are englobed in what is known as assisted reproductive technologies (ARTs). These involve *in vitro* handling of oocytes, sperm, and embryos for their use in reproduction and comprise *in vitro* fertilization (IVF),

## 15.3 Congresos



Consejo Directivo  
2017-2019

Dra. Angélica Trujillo  
Hernández  
Presidente

Dra. Margarita Martínez  
Gómez  
Vicepresidente

Dra. Carolina Morán Raya  
Secretaria

Dr. Francisco Castelan  
Prosecretario

Dra. Leticia Morales  
Ledesma  
Tesorera

Dr. José Ramón Eguibar  
Cuenca

Dr. Alonso Fernández Guasti  
Consejeros

Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C.

**AIBIR**

<http://www.aibir.org>  
[aibir2011@gmail.com](mailto:aibir2011@gmail.com)

Estimados académicos:

Mondragón-Payne O. F.  
Oseguera-López I.  
Ortiz-Sánchez P. B.  
Pérez-Cerezales S.  
Jiménez Morales I.  
Fierro R.  
González-Márquez H.

Por este conducto los saludamos cordialmente y les informamos que el trabajo titulado: **"El sulfonato de perfluorohexano (PFHxS) y sulfonato de perfluorooctano (PFOS) incrementan las especies reactivas de oxígeno y alteran la fosforilación de proteínas de espermatozoides de cerdo *in vitro*"** ha sido **ACEPTADO** para ser presentado en la modalidad de **CARTEL** durante la XLIV Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, que se celebrará del **26 al 29 de mayo del 2019 en el Hotel Misión de los Ángeles en la ciudad de Oaxaca.**

Reciban de antemano nuestro reconocimiento por su valiosa participación.

Atentamente  
Puebla. Pue. a 22 de abril de 2019

Dra. Angélica Trujillo Hernández  
Presidente

# SESIÓN DE ANDROLOGÍA

## NUEVAS TÉCNICAS Y DISPOSITIVOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA

Serafín Pérez Cerezales<sup>1</sup>, Sara Ruiz Díaz<sup>2</sup> y Iván Oseguera López<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Reproducción Animal, Madrid, España. <sup>2</sup>Mistral Fertility Clinics S.L., Clínica Tambre, Madrid, España. <sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México.

### INTRODUCCIÓN

En condiciones *in vivo* el espermatozoide ha de atravesar la mayor parte del tracto reproductor femenino hasta llegar al útero en la trompa de Falopio donde se produce la fecundación. A lo largo de este viaje el espermatozoide sufre una serie de cambios fisiológicos que lo habilitan para tal fin, proceso que se conoce como capacitación (Aitken and Nixon, 2013). Además, recientes investigaciones sugieren que tanto las exigentes condiciones del tracto reproductor femenino como diversas señales presentes en sus diversas estructuras configuran un mecanismo de selección espermática que asegura que solo una pequeña subpoblación de espermatozoides llega hasta el ovocito (Pérez-Cerezales et al., 2017). Esta subpoblación se supone una élite con las características adecuadas para la fecundación que además porta el material genético y epigenético intacto y adecuado para el correcto desarrollo posterior del embrión (Pérez-Cerezales et al., 2017). A pesar de que existen métodos de selección espermática *in vitro*, todavía no se ha conseguido emular para ello las condiciones que operan *in vivo*, por lo que estas metodologías siguen siendo subóptimas (Sakkas et al., 2015). Esto se ha sugerido que está en parte detrás de las bajas eficiencias reportadas en técnicas de reproducción asistida (TRAs) como la fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Los últimos informes de las sociedades americanas y europeas de reproducción y fertilidad (C.D.C., 2018; De Geyter et al., 2018) reportaron que las tasas de embarazo por transferencia tanto para FIV como ICSI rondaron el 37% llegando a término solo en torno al 25%. Estos porcentajes se aumentaron al 54% y 38% respectivamente cuando se utilizaron ovocitos frescos de donantes. En muchos casos en los que las TRAs fracasan desconocemos qué porcentaje de este se debe directamente al factor femenino o al masculino, pero es muy posible que la mejora de las técnicas de selección espermática sea especialmente relevante cuando es el factor masculino el que está presente (Simon et al., 2017). Por ello, la preparación del semen y su selección es un campo intenso de investigación en el que actualmente se están desarrollando diversas metodologías. En los últimos años, gracias a un mejor

conocimiento de la bioquímica y fisiología del espermatozoide, nuevas técnicas de selección espermática se han puesto a disposición de las clínicas prometiendo mejorar las tasas de fertilidad. Sin embargo, en muchos casos, los resultados publicados son contradictorios y no se han visto reforzados por resultados clínicos que los validen. En este documento que acompaña a la ponencia que presentamos en Cáceres en el X congreso de ASEBIR (noviembre de 2019) se resume el estado actual de las técnicas de selección espermática más empleadas y las más novedosas que han mostrado resultados prometedores.

### PREPARACIÓN RUTINARIA DE MUESTRAS SEMINALES

De manera rutinaria en la práctica clínica se aplican métodos de selección *in vitro* de los espermatozoides principalmente por tres motivos: i) eliminación del plasma seminal, ii) eliminación de restos de tejido epitelial y células sanguíneas y iii) enriquecimiento en espermatozoides motiles y con alta integridad genética (Henkel and Schill, 2003). Debido a su bajo coste, rapidez y eficacia las dos técnicas más empleadas para la preparación del semen son el "swim-up" (SU) y la centrifugación en gradiente (CG). En términos generales el SU consiste en la recuperación de los espermatozoides motiles mediante su migración hacia un medio libre de espermatozoides típicamente localizado encima de la muestra seminal, mientras que la CG consiste en la capacidad de los espermatozoides motiles de progresar a través de un gradiente de densidad (constituido por partículas coloidales) durante una centrifugación (Henkel and Schill, 2003).

Gran número de estudios han intentado clarificar cuál de estos dos métodos es más eficiente, sin embargo, los resultados disponibles en la literatura son múltiples y contradictorios. Hay consenso en que ambas técnicas enriquecen la muestra en espermatozoides motiles y con capacidad de fusionar su membrana con la del ovocito. Incluso se ha observado que ambas técnicas seleccionan aquellos espermatozoides con los telómeros más largos (Zhao et al., 2016), siendo este un indicador de espermatogénesis

### P61 | Comparison of Whitten's medium vs. synthetic human tubal fluid for the in vitro capacitation of frozen-thawed stallion spermatozoa

I Oseguera-López<sup>1</sup>; S Ruiz-Díaz<sup>2,3</sup>; D deLa Cuesta-Díaz<sup>2</sup>; MJ Sánchez-Calabuig<sup>4</sup>; B Macías-García<sup>5</sup>; A Gutiérrez-Adán<sup>3</sup>; S Pérez-Cereales<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad Izatapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México; <sup>2</sup>Mistral Fertility Clinics S.L., Clínica Tambre, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Departamento de Reproducción Animal, INIA, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Institute of Biotechnology in Agriculture and Livestock, University of Extremadura, Cáceres, Spain

Stallion spermatozoa fails to undergo capacitation under in vitro conditions making in vitro fertilization (IVF) unavailable in this specie. In other species, such as bovine, freezing-thawing triggers sperm capacitation and is essential prior to IVF. Herein we explored the use of Whitten's medium and synthetic human tubal fluid (HTF) after freezing-thawing for the capacitation of stallion spermatozoa. Cryopreserved spermatozoa from 4 stallions were thawed, diluted in both mediums and incubated for 3 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Motility was monitored by computer-assisted sperm analyses during the 3 h of incubation. Sperm viability, acrosome reaction and tyrosine phosphorylation were analyzed by flow cytometry using propidium iodide staining, PNA-FITC staining and fluorescence immunocytochemistry respectively at times 0 and 3 h of incubation. Differences between mediums were analyzed by Student's t-test. After 3 h of incubation both percentage of motile and viable spermatozoa were lower in HTF (13 ± 2% and 21 ± 2% respectively) than in Whitten's medium (26 ± 5% and 27 ± 2% respectively) ( $p < 0.05$ ). However, the peak of hyperactive spermatozoa reached during incubation was higher in HTF (11 ± 2%) than in Whitten's medium (4 ± 1%) ( $p < 0.01$ ). Further, the percentage of spermatozoa showing high levels of tyrosine phosphorylation after 3 h of incubation was higher in HTF (55 ± 7%) than in Whitten's medium (15 ± 2%) ( $p < 0.01$ ). We conclude that freezing-thawing facilitates sperm capacitation events in stallion spermatozoa being strongest when the spermatozoa are incubated after thawing for 3 h in HTF than in Whitten's medium. RYC-2016-20147 and IND2018/BIO-9610.

### P62 | NR3C1 expression in response to cortisol during bovine in vitro oocyte maturation

M Ruiz-Conca<sup>1</sup>; J Gardela<sup>1</sup>; M Alvarez-Rodriguez<sup>1,2</sup>; S Olvera-Maneu<sup>1</sup>; T Mogas<sup>3</sup>; M López-Béjar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ERPAW (Endocrinology, Reproductive Physiology and Animal Welfare) Research Group, Department of Animal Health and Anatomy, Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; <sup>2</sup>Dept Clinical and Experimental Medicine, BKH/OG, Linköping University, Linköping, Sweden; <sup>3</sup>Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Glucocorticoids (GCs) have essential functions in many cellular mechanisms like response to stress, apoptosis, metabolism and mitochondrial activity, mostly mediated by GCs interaction with the glucocorticoid receptor (NR3C1). After GCs binding, NR3C1 is translocated to the nucleus where it is involved in modulation of gene expression. Here we studied the levels of the NR3C1 receptor in bovine oocytes and cumulus cells (CCs) directly exposed to cortisol during in vitro maturation (IVM). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured under standard maturation conditions with cortisol (Control: 0 µg/mL, CORT: 0.25 µg/mL). After IVM, CCs were separated from oocytes ( $n = 340$ , per group) and proteins were extracted in RIPA buffer. Denatured samples (DTT) were mixed with loading buffer, run on polyacrylamide gel (4–20% Tris-Glycine) and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane. The membrane was blocked for 1 h and incubated overnight with NR3C1 anti-rabbit primary antibody (1:200) (GR/NR3C1 NBP2-42221, Novus Bio),  $\alpha$ -tubulin antibody (1:1000, 2 h) and anti-rabbit secondary antibody (1:10000, 3 h). Results showed the presence of protein signal, at the expected molecular weight for the NR3C1 receptor (86 kDa) only in CCs and not in oocytes, showing a slightly increase of 6.18% relative expression in CORT relative with control group. As NR3C1 regulation is under autoregulatory control, cortisol supplementation may be slightly affecting the expression of the receptor in the CCs. Cumulus cell-oocyte signaling are known to have a crucial role in oocyte development. Further studies are needed to elucidate how these changes in the expression of the receptor in response to cortisol are modulating the oocyte competence. This study was supported by AGL2016-79802-P and FPU15/06029.

### P63 | Relationship of the metabolic activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and the morphometry of bovine oocytes before and after in vitro maturation

J Duma; D Argudo; F Perea; L Ayala

Faculty of Agricultural Sciences, University of Cuenca-Ecuador

The aim of this study was to determine the relationship between the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) enzyme and the morphometry of bovine oocytes before and after in vitro



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00113

Matrícula: 2163802455

Efecto de la exposición de espermatozoides de cerdo a los perfluorados sulfonato de perfluorohexano (PFHxS) y sulfonato de perfluorooctano (PFOS).

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:00 horas del día 24 del mes de agosto del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ  
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES  
DRA. SONIA HERAS GARCIA  
DRA. ESTHER IVONNE LOPEZ BAYGHEN PATIÑO  
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

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

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: IVAN OSEGUERA LOPEZ

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

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

DRA. SONIA HERAS GARCIA

VOCAL

DRA. ESTHER IVONNE LOPEZ BAYGHEN PATIÑO

SECRETARIA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA