

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Maestra en Biología de la Reproducción Animal

**PRESENTA**

**Karla Gabriela Piña De la Rosa**

**Efecto del ácido perfluorodecanoico (PFDA) en la  
membrana de espermatozoides de cerdo durante la  
capacitación**

**Comité Tutoral**

Dra. Irma Jiménez Morales  
Codirectora

Dra. Reyna C. Fierro Pastrana  
Codirectora

Dr. José Antonio Herrera Barragán  
Asesor

Ciudad de México, a 17 de noviembre de 2023.

## Declaración de Originalidad

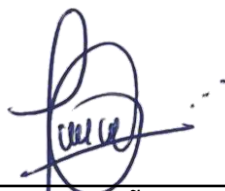
La que suscribe, **KARLA GABRIELA PIÑA DE LA ROSA** alumna del posgrado: MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Efecto del ácido perfluorodecanoico (PFDA) en la membrana de espermatozoides de cerdo durante la capacitación”**.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original, creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos, ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegar a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por su autoría y originalidad, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México, el 30 de octubre de 2023.

**Atentamente**



---

**KARLA GABRIELA PIÑA DE LA ROSA**

# Carta de Confidencialidad

Ciudad de México, a 30 de octubre de 2023

**Comisión Académica del Posgrado**  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**  
**P r e s e n t e.**

La que suscribe, **KARLA GABRIELA PIÑA DE LA ROSA**, alumna con número de matrícula **2213800869** del posgrado **MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **“Efecto del ácido perfluorodecanoico (PFDA) en la membrana de espermatozoides de cerdo durante la capacitación”** a desarrollar en LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD

IZTAPALAPA. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



---

**KARLA GABRIELA PIÑA DE LA ROSA**

## **Adscripción del Comité Tutorial**

### **Codirectora**

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana



---

Depto. Ciencias de la Salud, DCBS.  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa  
reyna@xanum.uam.mx

### **Codirectora**

Dra. Irma Jiménez Morales



---

Depto. Ciencias de la Salud, DCBS.  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa  
jimi@xanum.uam.mx

### **Asesor**

Dr. José Antonio Herrera Barragán



---

Depto. de Producción Agrícola y Animal. DCBS.  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.  
jherrerab@correo.xoc.uam.mx

## **Adscripción del Jurado del Examen de Grado**

### **Presidente**

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Depto. de Producción Agrícola y Animal. DCBS.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

[jherrerab@correo.xoc.uam.mx](mailto:jherrerab@correo.xoc.uam.mx)

### **Secretaria**

Dra. Ana Lilia Roa Espitia

CINVESTAV del IPN-Unidad Zacatenco

[aroa@cinvestav.mx](mailto:aroa@cinvestav.mx)

### **Vocal**

Dr. Enrique Othón Hernández González

CINVESTAV del IPN-Unidad Zacatenco

[eoton@cell.cinvestav.mx](mailto:eoton@cell.cinvestav.mx)

### **Vocal**

Dr. Humberto González Márquez

Depto. Ciencias de la Salud, DCBS.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

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

## Firma de los Miembros de Jurado

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Efecto del ácido perfluorodecanoico (PFDA) en la membrana de espermatozoides de cerdo durante la capacitación” con fecha 17 de noviembre de 2023.



---

**Presidente**  
Dr. José Antonio Herrera Barragán



---

**Secretaria**  
Dra. Ana Lilia Roa Espitia



---

**Vocal**  
Dr. Enrique Othón Hernández González



---

**Vocal**  
Dr. Humberto González Márquez

## **Datos de la Maestría y Leyendas Obligatorias**

### **Lugares de realización**

Laboratorio de Andrología. Depto. Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-Iztapalapa.

Laboratorio de Fisiología Veterinaria. Depto. Producción Agrícola y Animal. DCBS. UAM-Xochimilco

**El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONAHCyT (PNPC) con número de registro 003797.**

**Karla Gabriela Piña De la Rosa recibió apoyo mediante una beca del CONAHCyT para estudios de posgrado con número 1167758.**

**Este proyecto fue parcialmente financiado por subsidio del CONAHCYT a los convenios 52877-Z/66953 a Miguel Betancourt, y 0105961 a Reyna Fierro.**

## AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi Codirectora de Tesis, Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana por el conocimiento compartido, así como el tiempo y apoyo que me ha brindado desde el primer día. Me siento muy orgullosa de ser su alumna, gracias por creer en mí y brindarme un lugar en su laboratorio. Siempre estaré agradecida con Dios y con la vida por haberme permitido compartir esta etapa tan maravillosa al lado de una persona tan inteligente, buena y valiente como usted.

A la Dra. Irma Jiménez Morales por su apoyo, tiempo, dirección y retroalimentación, así como al Dr. Antonio Herrera por su dirección y apoyo para concluir este proyecto.

Al Dr. Humberto González Márquez por abrirme las puertas de su laboratorio y por el amable apoyo que me ha brindado.

A la Dra. Paola Berenice Ortiz Sánchez, por compartirme su conocimiento día tras día sin importar el horario, fecha o situación. Gracias por enseñarme tantas cosas en el laboratorio, gracias por la paciencia y también por las largas jornadas de trabajo. Sin duda alguna, usted ha sido un gran pilar en mi formación y le estaré eternamente agradecida. También agradezco a la Dra. Leslye Sámano, por apoyarme en todo momento y siempre tener las palabras exactas para hacernos sentir bien. Gracias por los días largos de trabajo y por su apoyo total, usted se ha convertido en una parte fundamental de mi formación, gracias infinitas.

Al Mtro. Oscar Mondragón, por sus consejos, por el apoyo en experimentos y por su tiempo.

A los miembros del Jurado Dra. Ana Lilia Roa Espitia, Dr. José Antonio Herrera Barragán, Dr. Enrique Othón Hernández González y Dr. Humberto González Márquez, por sus observaciones y su amable atención al presente trabajo.

A la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, por haberme dado la oportunidad de ser parte de su alumnado y especialmente a la Dra. Socorro Retana Márquez, por brindarnos su conocimiento, así como su apoyo total a lo largo de la maestría.

A CONAHCyT por otorgarme una beca para estudios de posgrado.



## **DEDICATORIAS**

*A mi madre Margarita De la Rosa, por brindarme su apoyo incondicional y porque a pesar de que no ha sido fácil aquí seguimos, juntas y al pie del cañón. Sabes lo importante que eres para mí y lo orgullosa que estoy de ser tu hija. Gracias por estar conmigo sin importar lo difícil que ha sido el camino. Esto y todo lo que logre siempre estará dedicado a ti.*

*A mi papá Javier Piña, gracias por las palabras de ánimo en las mañanas y recordarme que no debo rendirme. Gracias por estar durante esta etapa de mi formación y por enseñarme que por más dura que sea la vida, debemos levantarnos y seguir adelante por las personas que amamos.*

*A mi hermana por su apoyo y porque sé que en cualquier momento que la necesite estará ahí. A JJ, porque has estado apoyándome con firmeza desde el inicio de este sueño, hoy que lo estoy concluyendo no tengo las palabras suficientes para agradecer todo el apoyo que me has brindado. Sabes que eres una persona muy especial en mi vida y con la que quiero seguir compartiendo sueños y metas. Gracias infinitas por todo el apoyo y por estar en las buenas y no tan buenas.*

*A mis sobrinos Briza, Liam y Joshua, por hacerme sentir el amor puro e incondicional. Cuando crezcan y lean estas líneas quiero que se sientan felices porque su tía lucha día a día para tratar de ser un buen ejemplo para ustedes. Quiero que sepan que todo lo que hago es por y para ustedes, pero lo más importante que me gustaría que supieran es que, cualquier meta, por más difícil que sea, se puede lograr. Recuerden que cada segundo de esta etapa estuvo dedicado a ustedes, los amo y siempre estaré para apoyarlos en su camino.*

*A la Dra. Reyna, Dra. Pao y Dra. Leslye: gracias por enseñarme que existen personas buenas y leales, nunca dejaré de agradecerles todo su apoyo.*

*A todos mis amigos con los que compartí sonrisas, diversión, aventuras y risas. Gracias por hacer mi vida tan bonita y divertida.*

*A Dios, porque me has enseñado que tus tiempos son perfectos y me demuestras que todo vale la pena. Gracias por no soltarme y ser tan bueno conmigo.*

## Resumen

Los compuestos perfluorados como el ácido perfluorodecanoico (PFDA) se han utilizado en la industria desde los años 50, afectando la salud de personas ocupacionalmente expuestas; su acumulación en el organismo y persistencia en el ambiente han generado preocupación. Actualmente incrementó significativamente el interés en estudiar los daños en la salud reproductiva, esto debido a la exposición ambiental y ocupacional a los contaminantes tóxicos. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del PFDA sobre la mortalidad y la fisiología de la membrana de espermatozoides de cerdo durante la capacitación *in vitro*. Se realizaron ensayos de toxicidad en los espermatozoides utilizando concentraciones crecientes de PFDA. Se encontró que con 500 y 750  $\mu\text{M}$  de PFDA, la mortalidad de los espermatozoides fue de 44 y 89 %, respectivamente, diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (24%) ( $P < 0.05$ ). Se calculó la  $\text{CL}_{50}$  de PFDA mediante una prueba de PROBIT la cual fue de 362  $\mu\text{M}$ . Se realizó una prueba con solución hiposmótica y se encontró que el PFDA dañó significativamente la membrana plasmática de los espermatozoides con respecto al grupo control (17%); el daño fue creciente conforme aumentó la concentración, con 150  $\mu\text{M}$  de PFDA se obtuvo 34% de daño y con 750  $\mu\text{M}$  llegó a 89%. Para determinar si el daño afectaba la capacitación espermática y la distribución de los microdominios de membrana, se probaron concentraciones subletales ( $1/5\text{CL}_{50}$ ,  $1/2\text{CL}_{50}$  y  $\text{CL}_{50}$ ); la proporción de espermatozoides capacitados disminuyó de manera significativa con respecto al control (66%), llegando sólo a 26, 39 y 29% de capacitación, respectivamente ( $P < 0.05$ ); también se observó que afectan la distribución de los microdominios de membrana presentando patrones

que son característicos de espermatozoides que no han realizado el proceso de capacitación.

Con los resultados obtenidos se concluyó que la concentración letal media del PFDA en espermatozoides de cerdo fue menor a la reportada para PFOS y aproximadamente cinco veces menor que la reportada para PFHxS y PFOA, es decir, se determinó que es más tóxico. También se encontró que la exposición de los espermatozoides a concentraciones subletales de PFDA altera la fisiología de la membrana de los espermatozoides impidiéndoles responder ante una solución hiposmótica y modificando la distribución de los microdominios de membrana durante la capacitación. Lo anterior se relaciona con la disminución de la eficiencia de los espermatozoides para realizar los procesos de la capacitación, indispensables para que adquiera la habilidad de poder fecundar al óvulo. Hasta donde se sabe, no se han realizado estudios específicos acerca del daño que ocasiona PFDA en la fisiología del espermatozoide, los resultados de esta investigación indican que tiene un impacto negativo en la fertilidad masculina, sin embargo, se deben hacer más estudios para determinar su mecanismo de acción.

## Abstract

Perfluorinated compounds such as perfluorodecanoic acid (PFDA) have been used in industry since the 50s, affecting the health of occupationally exposed individuals; their accumulation in the body and persistence in the environment are of concern. Around 2020, interest in studying reproductive health damage due to environmental and occupational exposure to toxic contaminants increased significantly. The objective of the present study was to determine the effect of PFDA on boar sperm mortality and membrane during *in vitro* capacitation. Sperm toxicity tests were performed using various concentrations of PFDA. It was found that at 500 and 750  $\mu\text{M}$  PFDA, spermatozoa mortality was 44 and 89%, respectively, a significant difference from the control group (24%) ( $P < 0.05$ ). The  $\text{LC}_{50}$  of PFDA was 362  $\mu\text{M}$  calculated using regression PROBIT analysis. A hypoosmotic solution test was performed, finding that PFDA significantly damaged the spermatozoa plasma membrane concerning the control group (17%); the damage was increasing as the concentration increased, with 150  $\mu\text{M}$  PFDA 34% damage, and 89%, with 750  $\mu\text{M}$ . The damage in sperm capacitation and the distribution of membrane microdomains was determined with sublethal concentrations ( $\frac{1}{5}\text{CL}_{50}$ ,  $\frac{1}{2}\text{CL}_{50}$ , and  $\text{CL}_{50}$ ); the proportion of capacitated spermatozoa decreased significantly concerning the control (66%), reaching only 26, 39, and 29% capacitation, respectively ( $P < 0.05$ ); it was also observed that they affect the distribution of membrane microdomains having high percentages of patterns that are characteristic for spermatozoa that have not undergone the capacitation process. The conclusion is that the mean lethal concentration of PFDA in boar spermatozoa was lower than that reported for PFOS and approximately five times lower than that reported for PFHxS

and PFOA, so it is more toxic. Exposure of spermatozoa to sublethal concentrations of PFDA altered sperm membrane physiology by preventing them from reacting to a hypoosmotic solution and modifying the distribution of membrane microdomains during capacitation. This is related to a decrease in the efficiency of the spermatozoa to carry out the capacitation process that is indispensable for the spermatozoa to acquire its fertilizing powerfully. To our knowledge, no studies have been conducted on the damage caused by PFDA on sperm physiology. The results of this research indicate that this toxicant harms male fertility. However, further studies are needed to determine its mechanism of action.

# Índice

<i>Declaración de Originalidad</i> .....	<i>ii</i>
<i>Carta de Confidencialidad</i> .....	<i>iii</i>
<i>Adscripción del Comité Tutorial</i> .....	<i>iv</i>
<i>Adscripción del Jurado del Examen de Grado</i> .....	<i>v</i>
<i>Firma de los Miembros de Jurado</i> .....	<i>vi</i>
<i>Datos de la Maestría y Leyendas Obligatorias</i> .....	<i>vii</i>
<i>Agradecimientos</i> .....	<i>viii</i>
<i>Dedicatorias</i> .....	<i>ix</i>
<i>Resumen</i> .....	<i>x</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xii</i>
<i>Índice</i> .....	<i>xiv</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Sustancias perfluoroalquiladas (PFAS)</i> .....	<b>1</b>
1.2 <i>Ácido perfluorodecanoico (PFDA)</i> .....	<b>3</b>
1.3 <i>Morfología del espermatozoide de mamífero</i> .....	<b>5</b>
1.4 <i>Capacitación espermática</i> .....	<b>6</b>
1.5 <i>Membrana plasmática</i> .....	<b>7</b>
1.6 <i>Microdominios de membrana (MDM)</i> .....	<b>9</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>11</b>
2.1 <i>Efectos de los PFAS</i> .....	<b>11</b>
2.2 <i>Efectos del ácido perfluorodecanoico (PFDA)</i> .....	<b>12</b>

2.3	<i>Efectos de los compuestos PFAS en la capacitación in vitro</i> .....	13
3.	<i>Justificación</i> .....	14
4.	<i>Pregunta de investigación</i> .....	14
5.	<i>Hipótesis</i> .....	15
6.	<i>Objetivo general</i> .....	15
7.	<i>Objetivos específicos</i> .....	15
8.	<i>Diseño experimental</i> .....	16
9.	<i>Métodos</i> .....	16
9.1	<i>Muestras de semen</i> .....	16
9.2	<i>Evaluación básica</i> .....	17
9.3	<i>Concentración letal media (CL<sub>50</sub>)</i> .....	18
9.4	<i>Evaluación de la integridad de la membrana plasmática</i> .....	18
9.5	<i>Capacitación in vitro</i> .....	18
9.6	<i>Tratamiento con PFDA</i> .....	20
9.7	<i>Evaluación de la distribución de MDM</i> .....	20
9.8	<i>Análisis estadístico</i> .....	20
10.	<b>RESULTADOS</b> .....	21
10.1	<i>Efecto del PFDA en la mortalidad espermática</i> .....	21
10.2	<i>Efecto del PFDA en la integridad de la membrana plasmática</i> .....	22
10.3	<i>Efecto del PFDA en la capacitación espermática</i> .....	24
10.4	<i>Efecto del PFDA en la distribución de microdominios de membrana</i> .....	25

11. <i>Discusión</i> .....	28
12. <i>Conclusiones</i> .....	35
13. <i>Referencias bibliográficas</i> .....	36



## **1. INTRODUCCIÓN**

Los compuestos perfluorados le han facilitado el día a día a los humanos, pero su bioacumulación y persistencia en el ambiente han generado gran preocupación. Debido a esto, en los últimos años se ha registrado un creciente interés por saber el mecanismo por el cual estos compuestos afectan a la salud en general, así como la salud reproductiva.

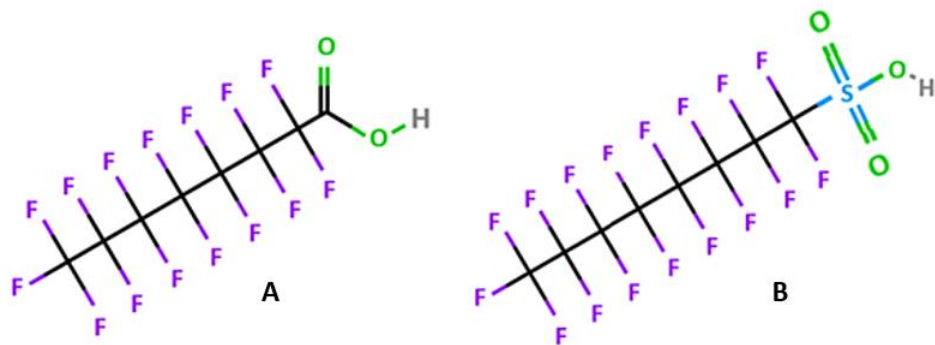
### **1.1 Sustancias perfluoroalquiladas (PFAS)**

Los compuestos perfluorados (PFCs o PFAS) son productos sintetizados químicamente que han sido incorporados en una gama amplia de productos en las últimas seis décadas (Paul, 2009). Su estructura es una cadena de carbonos enlazados a átomos de flúor y un grupo ácido o amida situado en el extremo de la cadena de carbonos. Debido a la fuerza del enlace carbono-flúor y a su origen sintético, las PFAS presentan gran resistencia a hidrólisis, fotólisis y degradación, lo que les confiere persistencia en el ambiente y causa su acumulación en el organismo (Giesy *et al.*, 2001; Kissa, 2001). En los últimos años ha crecido la evidencia que revela que los humanos estamos altamente expuestos a estos compuestos y a su toxicidad (Calafat, *et al.*, 2019; Richterová, *et al.*, 2023). La exposición puede ser por medio de alimentos contaminados por tierra y agua, por envases de alimentos o por los utensilios que se usan para procesar alimentos (Rahman *et al.*, 2014; EPA, 2016). Otra forma de exposición es con el uso de productos de uso cotidiano como repelentes a las manchas y al agua, alfombras, textiles, papel, así como utensilios de cocina por su material

antiadherente (Alexander & Olsen, 2007). El agua potable también es una fuente de exposición (Rahman *et al.*, 2014; EPA, 2016).

Las principales formas de sintetizar PFAS son la fluoración electroquímica, donde un hidrocarburo saturado se hace reaccionar con ácido fluorhídrico (HF) usando electricidad para sustituir todos los átomos de hidrógeno por flúor. El otro proceso de síntesis es la telomerización, la cual consiste en la reacción de perfluoroetileno ( $\text{CF}_2=\text{CF}_2$ ) y yoduro de perfluoroetilo ( $\text{CF}_3-\text{CF}_2\text{I}$ ) para producir cadenas lineales perfluoradas. La estructura química que se logra les confiere propiedades como la resistencia al fuego, así como repelencia al aceite, al agua y a la tinción, por lo que se utilizan en las industrias textil, eléctrica, automotriz, construcción, entre otras (Kissa, 2001; Lehmler, 2005).

Las PFAS se agrupan de acuerdo con la cantidad de átomos de carbono que están presentes en su estructura química y se dividen en dos categorías: 1) Sulfonatos, entre los que se encuentran el ácido perfluorohexano sulfónico (PFHxS, con fórmula  $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_5-\text{SO}_3\text{H}$ ) y el ácidoperfluorooctano sulfónico (PFOS, con fórmula  $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_7-\text{SO}_3\text{H}$ ), y 2) Carboxilatos, entre los que se encuentra el ácido perfluorooctanoico (PFOA, con fórmula  $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_6-\text{COOH}$ ) y el ácido perfluorodecanoico (PFDA) con fórmula  $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_8-\text{COOH}$ ). Las PFAS más estudiadas son PFOA y PFOS, que poseen una cadena de ocho átomos de carbono, variando en el número de átomos de flúor (14 y 17, respectivamente) y en el grupo funcional terminal donde PFOA tiene un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), y PFOS un grupo sulfonato ( $-\text{SO}_3^-$ ) (Figura 1).

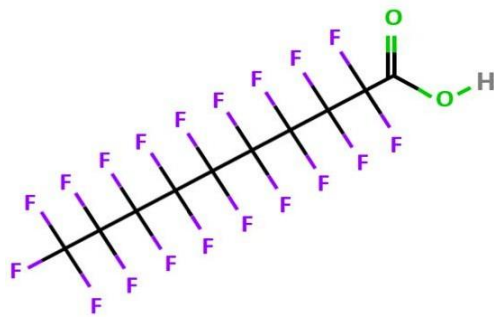


**Figura 1. Estructura química de los PFAS. A) ácido perfluorooctanoico (PFOA) que contiene 8 átomos de carbono, 15 átomos de flúor y un grupo carboxilo terminal; B. ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS) que contiene 8 átomos de carbono, 17 átomos de flúor y un grupo sulfonato. Tomada y modificada de CNIB, 2023.**

Se ha demostrado que las PFAS son extremadamente resistentes a la degradación ambiental y a la eliminación metabólica por las propiedades que les brinda su estructura química (Cousins *et al.*, 2020). Se ha calculado que, bajo condiciones ambientales típicas, la vida media de algunas PFAS es de 41 hasta 92 años (EPA, 2012) y en suero humano de 4 a 5 años, por lo que puede tener un gran impacto en humanos y animales (Alexander & Olsen, 2007). Se ha encontrado presencia de PFAS en tejidos de humanos expuestos a comida, agua y aire contaminadas con estos tóxicos (Prevedouros *et al.*, 2006).

## 1.2 Ácido perfluorodecanoico (PFDA)

El PFDA es una sustancia de 10 carbonos con fórmula química  $C_{10}HF_{19}O_2$ , con un grupo terminal carboxilo (-COOH) y con peso molecular de 514.08 g/mol (Figura 2) y considerada una sustancia química persistente (Deng *et al.*, 2021; CNIB, 2023).



**Figura 2. Estructura del ácido perfluorodecanoico (PFDA) que contiene 10 átomos de carbono, 19 átomos de flúor y un grupo carboxilo terminal. Tomada y modificada de CNIB (2023).**

Al igual que los compuestos perfluorados descritos anteriormente, el PFDA es una sustancia química sintética que tiene un papel como xenobiótico y contaminante ambiental, utilizado para la producción de productos de consumo humano como textiles, muebles, cosméticos, equipos médicos, pesticidas, envasado de alimentos, entre otros (Deng *et al.*, 2021).

Los humanos estamos expuestos al PFDA por alimentos, agua o suelo contaminados, así como con el uso de productos de uso cotidiano, mencionados anteriormente (Rahman *et al.*, 2014; EPA, 2016). Se sabe que el contacto directo de la piel con productos de consumo y suministros médicos es la ruta de exposición principal del PFDA en humanos (Shigei *et al.*, 2020).

En años recientes, se ha registrado un creciente interés en la contribución de exposiciones ambientales y ocupacionales a contaminantes tóxicos en la salud reproductiva debido a que la información acerca de la fisiología del espermatozoide en los procesos esenciales previos a la fertilización es incipiente.

### 1.3 Morfología del espermatozoide de mamífero

Los espermatozoides de mamífero son células alargadas que tienen cabeza y flagelo. La cabeza posee el núcleo y, por encima, en la parte apical de la cabeza, se encuentra el acrosoma que contiene enzimas hidrolíticas capaces de degradar a la zona pelúcida (ZP) del ovocito, este acrosoma está formado por una membrana interna y una externa. El flagelo le confiere al espermatozoide la capacidad de moverse y desplazarse, se divide en pieza media, pieza principal y pieza terminal. En la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial; entre la pieza media y la pieza principal está el anillo. En conjunto, todas estas estructuras no deben alterarse para que el espermatozoide pueda fertilizar al óvulo (Figura 3) (Hafez & Hafez, 2017).

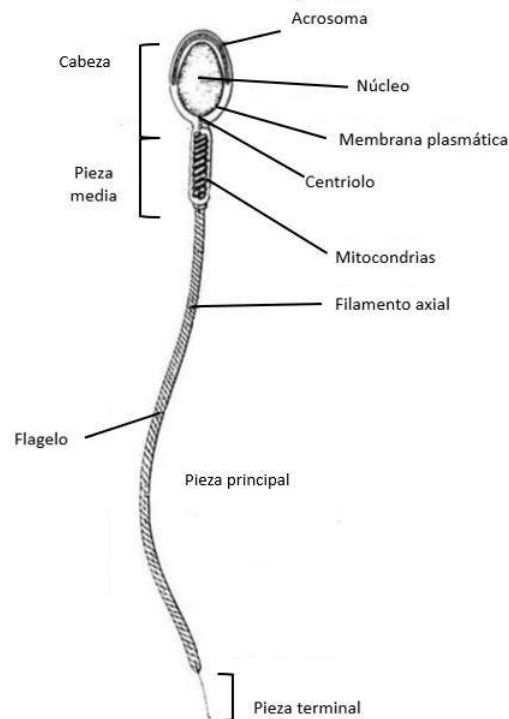
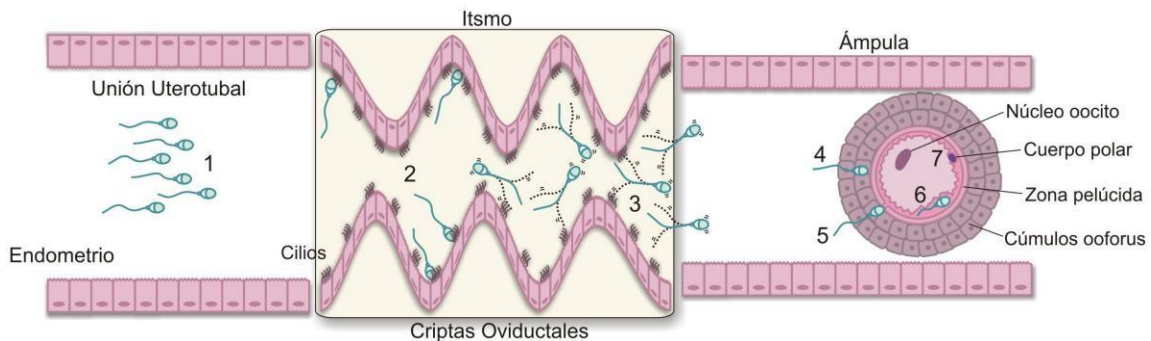


Figura 3. Estructura del espermatozoide de mamífero. Tomada y modificada de Hidalgo (2005).

## 1.4 Capacitación espermática

Al momento en que los espermatozoides son eyaculados, aún no tienen la capacidad de fertilizar al ovocito. Esta capacidad la adquieren durante su paso por el tracto reproductivo femenino mediante un proceso llamado capacitación espermática (Figura 4). En este recorrido, el espermatozoide sufre cambios bioquímicos y membranales (de Lamirande & Gagnon, 1998; de Lamirande & Gagnon, 2003).



**Figura 4. Trayecto de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino. A) Después de la eyaculación, una población de espermatozoides alcanza el tracto reproductivo femenino, específicamente la unión uterotubal en el endometrio. B) Sólo unos algunos espermatozoides llegan al istmo del oviducto para realizar la capacitación espermática. C) En la región del ámpula, únicamente el espermatozoide capacitado correctamente puede fertilizar al ovocito. Tomada de Olivera *et al.*, 2006.**

En el proceso de la capacitación, la membrana de los espermatozoides sufre modificaciones entre las que se destacan el reordenamiento de proteínas y lípidos, dándose a la vez un flujo de salida de colesterol importante, modulado por secreciones del tracto reproductivo femenino. Este eflujo del colesterol le confiere fluidez a la membrana plasmática activando canales de bicarbonato y calcio (Rodríguez *et al.*, 2019). El bicarbonato activa a la adenilciclase, lo que induce un incremento en los niveles de adenosil monofosfato cíclico (AMPc) que, a su vez, activa la proteína

quinasa A (PKA) que fosforila proteínas en sus residuos de tirosina en el citoplasma espermático. El papel de la fosforilación es vital, debido a que induce cambios conformacionales en las proteínas y fosfolípidos de la membrana plasmática, lo que prepara al espermatozoide para la unión subsecuente con el ovocito (Visconti *et al.* 1995a; Visconti *et al.* 1995b) (Figura 5).

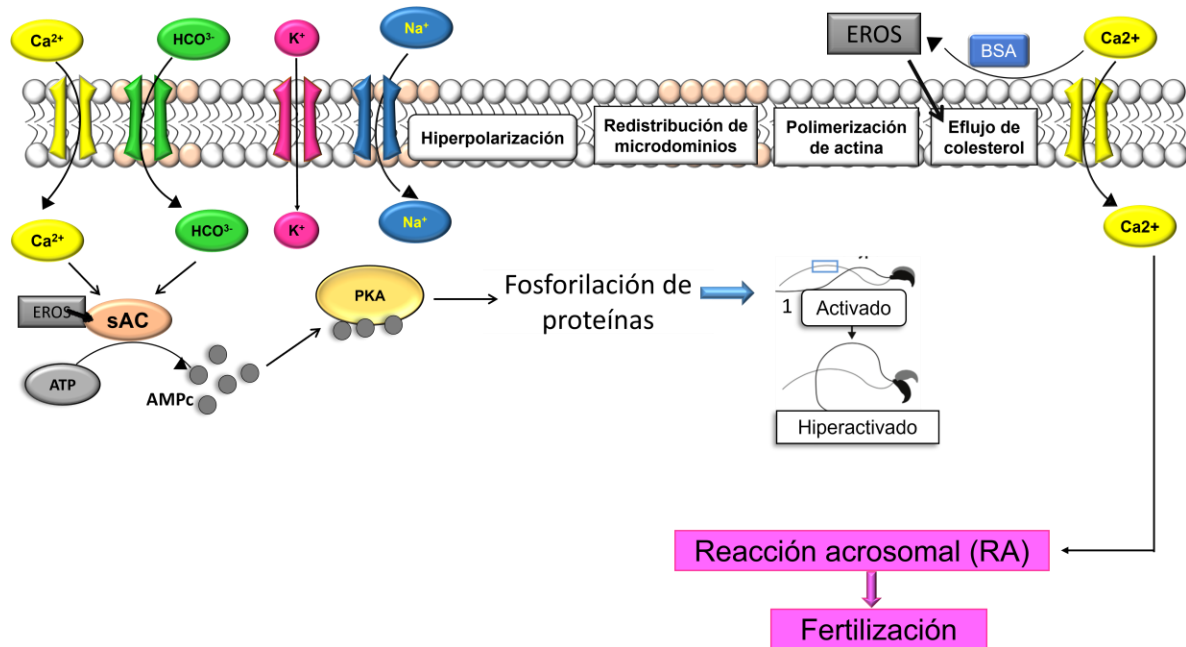


Figura 5. Esquema de la capacitación espermática. Tomado de Ortiz-Sánchez (2022) modificado de Bainbridge & Carlson (2019).

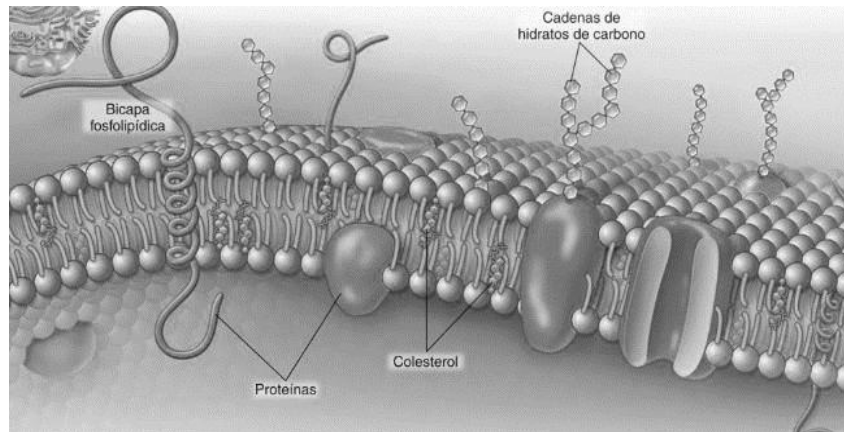
### 1.5 Membrana plasmática

La membrana plasmática está formada por una bicapa lipídica a la que se asocian proteínas y carbohidratos. Los glicolípidos y los esfingolípidos suelen ser los lípidos predominantes en las membranas biológicas, figurando también el colesterol como un componente básico de la membrana plasmática. Los fosfolípidos poseen una región polar y dos colas no polares. Las colas no polares o hidrofóbicas consisten en las

porciones de la cadena de hidrocarburos de los ácidos grasos (Erwin, 2004). En las bicapas, los lípidos se orientan de forma que sus grupos polares están en contacto con el medio acuoso y sus segmentos de hidrocarburos se enfrentan entre sí; en consecuencia, los grupos polares de cada mitad de la bicapa están orientados en sentido contrario (Figura 6) (Tapia *et al.*, 2012).

Para tratar de comprender esta estructura tan dinámica, Singer y Nicolson (1972) describieron el modelo del mosaico fluido. Éste describe las membranas como un mosaico fluido en el que las proteínas se insertan en una bicapa lipídica. Mientras que los fosfolípidos proporcionan la organización estructural básica, las proteínas de membrana llevan a cabo las funciones específicas de las membranas de la célula (Tapia *et al.*, 2012). Estas proteínas, a su vez, se dividen de acuerdo con la naturaleza de su asociación con la membrana en transmembranales, que están incrustadas directamente dentro de la bicapa lipídica, y no transmembranales, que se asocian indirectamente con la superficie polar de la bicapa lipídica (Singer & Nicolson, 1972). Todas desempeñan un papel crucial en el reconocimiento entre células (por ejemplo, en la fecundación) y en cómo se organiza la célula; además, mientras las transmembranales son responsables de la regulación de los procesos de señalización que permiten a la célula responder a señales externas, o participan en el transporte selectivo de moléculas a través de la membrana, entre otras funciones (Erwin, 2004; Tapia *et al.*, 2012).



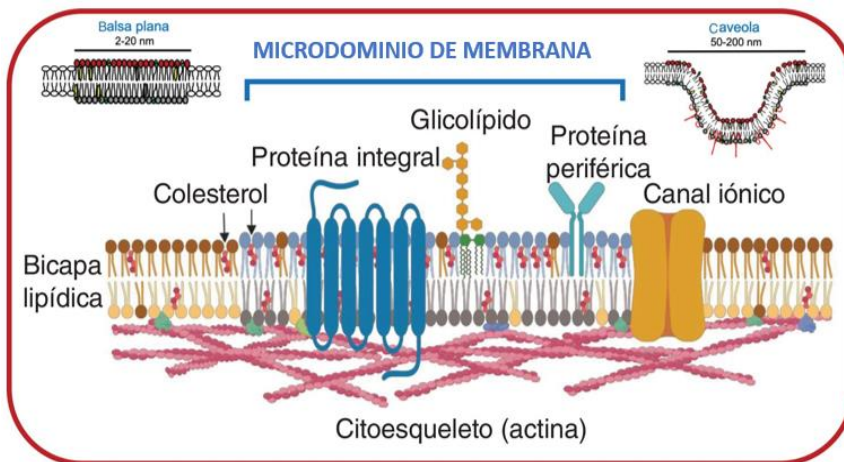


**Figura 6. Estructura de la membrana plasmática. Tomada y modificada de Patton (2021).**

### **1.6 Microdominios de membrana (MDM)**

Una estructura descrita hace relativamente poco tiempo en la membrana plasmática son los microdominios de membrana (MDM) (Maxfield, 2002). Los MDM, también llamados “lipid rafts” o balsas lipídicas (Harder *et al*, 1998; Schmitz & Grandl, 2008) miden de 10-200 nm, son heterogéneos y muy dinámicos, enriquecidos en esteroides y esfingolípidos. Estas pequeñas balsas pueden, eventualmente, ser estabilizadas para formar plataformas de mayor tamaño a través de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (Schmitz & Grandl, 2008; Meza *et al.*, 2010). Entre las funciones principales de los MDM se encuentran el tráfico de membranas, la polarización y la señalización celular (Schmitz & Grandl, 2008). A la fecha, se reconocen dos tipos de MDM: balsas planas y caveolas (Figura 7); ambas están enriquecidas en fosfolípidos saturados, esfingolípidos, glicolípidos, colesterol y proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Schmitz & Grandl, 2008) así como a proteínas específicas tales como la flotilina y la caveolina.

Las balsas planas están alineadas en el plano de la membrana y su caracterización ha sido bastante difícil porque son muy dinámicas y tienen un tamaño muy pequeño. Por otro lado, las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que miden 50-100 nm de diámetro, están involucradas en procesos de potocitosis y transcitosis, son dinámicas, pero en menor proporción a las balsas planas (Anderson, 1998); pueden estar asociadas con el citoesqueleto (Kawano *et al.*, 2011).



### Composición:

- **Colesterol**
- **Esfingolípidos**
- **Glicoproteínas**
- **Glicoesfingolípidos**

**Figura 7. Estructura de los microdominios de membrana. Tomado y modificado de Meza y colaboradores (2021).**

El enriquecimiento de estos componentes hidrofóbicos dota a estos dominios lipídicos de propiedades físicas distintas, entre ellas, un mayor empaquetamiento, orden de los lípidos y menor fluidez (Sezgin *et al.*, 2017). Entre las proteínas esenciales se encuentran las flotilinas que son proteínas recurrentemente encontradas en las balsas lipídicas. Estas proteínas pertenecen a una superfamilia que se caracteriza por contener el dominio SPFH (*Stomatin, Prohibitin, Flotilin y HflC/K*). Proteínas con este dominio tienen funciones en varios organismos y tejidos, pero tienen en común que se comportan como proteínas membranales con la capacidad de oligomerizarse para

formar microdominios (Guzmán *et al.*, 2019).

Las células de mamíferos tienen dos tipos de flotilinas, denominadas Flotilina-1 (Flo-1) y Flotilina-2 (Flo-2). Como parte integral de las balsas lipídicas, las flotilinas tienen funciones diversas, como participar activamente en la formación y mantenimiento de la propia balsa lipídica, actúan como potenciadores y moduladores de las actividades de las cinasas, entre otras. Debido a que son componentes invariables de las balsas lipídicas, suelen ser usadas como marcadores de los MDM (Guzmán *et al.*, 2019). Por otro lado, los MDM también reclutan proteínas específicas ancladas a glicofosfolípidos o proteínas modificadas con cadenas acil-lipídicas, o combinaciones (Anderson, 1998), sirven como centros de tráfico de colesterol para las rutas de transducción de señales en la membrana plasmática (Gibson *et al.* 2009; Lucio, 2003). El estudio de los MDM es un tema vigente y de gran interés debido a que la membrana plasmática interviene en procesos esenciales en la fisiología del espermatozoide (Meza *et al.*, 2010).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Efectos de los PFAS**

Los PFAS, una vez que se absorben, se acumulan debido a que se unen a proteínas séricas como la albúmina (Hundley *et al.*, 2006), también pueden distribuirse y acumularse en varios tejidos, como se detalla más adelante, por lo que pueden ocasionar daño tanto en animales como en humanos (Cassone *et al.*, 2012). Compuestos como PFOS se han encontrado en leche materna, hígado, cordón umbilical y en líquido seminal (Lau *et al.*, 2007). Se ha sugerido que las PFAS están relacionados con la infertilidad ya que, estudios revelaron que mujeres expuestas a

PFAS tienen cambios en su ciclo menstrual (Fei *et al.*, 2009) además, se ha reportado disminución en espermatozoides morfológicamente normales y en su cantidad en eyaculados de hombres ocupacionalmente expuestos a PFAS (Joensen *et al.*, 2009; Toft *et al.*, 2012). En condiciones *in vitro*, se ha reportado que PFAS como PFOS, PFOA y PFHxS afectan los procesos de capacitación espermática y reacción acrosomal, así como la movilidad de espermatozoides de cerdo (Oseguera *et al.*, 2020; Ortiz *et al.*, 2022). También se demostró que PFOS (Šabović *et al.*, 2019) y PFOA producen daños en la integridad y función de la membrana plasmática, así como la inhibición en la distribución de los microdominios de membrana (Ortiz *et al.*, 2022). A pesar de las evidencias que demuestran los daños que ocasionan las PFAS en la salud, sólo PFOS y PFOA, de una gran lista de compuestos perfluorados, se han considerado como contaminantes orgánicos persistentes debido a su bioacumulación, persistencia y toxicidad natural (Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2008).

## **2.2 Efectos del ácido perfluorodecanoico (PFDA)**

Desde hace ya varios años se han demostrado asociaciones entre compuestos perfluorados como el PFDA y alteraciones en la salud, tanto en humanos como en animales (Campbell *et al.*, 2021). Por ejemplo, ratas macho tratadas con 40 y 80 mg/kg de PFDA provocaron reducción del peso corporal, así como reducción de la ingesta de alimentos en la dosis más alta (Bookstaff *et al.* 1990). Algunos autores sugirieron que los efectos del PFDA son similares al síndrome de emaciación (adelgazamiento patológico). Este síndrome, también observado en ratas expuestas a TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, compuesto persistente, clasificado como

contaminante ambiental de amplia distribución, químicamente muy estable y tóxico) (Long *et al.*, 2013). En ratas hembra Sprague-Dawley se demostró que el PFDA es un inhibidor no competitivo y reversible de las enzimas peroxisomales acil-CoA oxidasa grasa (HYDRA) y de la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (DEHYDRO) (la proteína peroxisomal bifuncional) (Borges *et al.*, 1993). En ratas macho tratadas con dosis de 40 y 80 mg/kg de PFDA, se reportaron reducciones de los niveles plasmáticos de testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT) (Bookstaff *et al.* 1990). De igual manera, en un estudio del Programa Nacional de Toxicología (NTP, 2019) se reportó disminución de los niveles séricos de T con dosis diarias de 1.25 y 2.25 mg/kg de PFDA durante 28 días (NTP, 2019). En un estudio realizado *in vitro* se utilizaron células de Leydig aisladas de rata que fueron expuestas a 10  $\mu$ M de PFDA durante 48 horas, se reportó la disminución en un 75%, de la síntesis de progesterona y testosterona estimuladas por la gonadotropina coriónica humana (hCG), en ausencia de citotoxicidad o alteraciones morfológicas importantes (Boujrad *et al.*, 2000).

### **2.3 Efectos de los compuestos PFAS en la capacitación *in vitro***

PFOS y PFOA afectaron la funcionalidad de la membrana de espermatozoides de cerdo durante la capacitación *in vitro* e impidieron la reacción acrosomal, también impidieron la pérdida de colesterol durante la capacitación y alteraron la organización de los MDM, concluyendo que ambos causan alteraciones en la funcionalidad de la membrana plasmática espermática (Ortiz *et al.*, 2022). También se evaluaron los efectos tóxicos y las posibles alteraciones causadas por la presencia de PFOS y PFHxS en espermatozoides de cerdo y se encontró que ambos tóxicos provocan mortalidad espermática alta, alteraron la fosforilación de proteínas, incrementaron los

niveles de especies reactivas de oxígeno y la fragmentación del ADN (Oseguera *et al.*, 2020). A pesar de que se han logrado dilucidar algunos efectos de PFOA y PFOS en los espermatozoides, aún es escasa la información acerca de los efectos del PFDA en los espermatozoides durante la capacitación *in vitro*.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las PFAS constituyen una familia de más de 3,000 productos químicos conocidos como “las sustancias químicas eternas”, como se mencionó anteriormente. Su fabricación comenzó en los años 40 y, desde entonces se han utilizado en productos industriales y comerciales que utilizamos día a día como productos de limpieza, antiadherentes, como el teflón; compuestos para pulir, ceras, pinturas, pesticidas, envoltorios de alimentos, etc. En la última década, la producción de estos compuestos ha sido de toneladas por año. A pesar de que no presentan toxicidad aguda, se han reportado efectos negativos en la salud humana, animal y un impacto negativo al medio ambiente. Asimismo, no se conoce el mecanismo por el que producen toxicidad crónica. Debido al daño que causan las PFAS en la salud y específicamente en los espermatozoides, se plantea el presente proyecto.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los daños que ocasiona el PFDA en la membrana de espermatozoides de cerdo en condiciones de capacitación *in vitro*?

## **5. HIPÓTESIS**

El efecto tóxico de las PFAS se ha asociado con efectos en la membrana plasmática, al incubar espermatozoides de cerdo con PFDA durante la capacitación, se espera encontrar deterioro en su respuesta osmótica, disminución en la eficiencia del proceso de capacitación y alteración en la distribución de MDM.

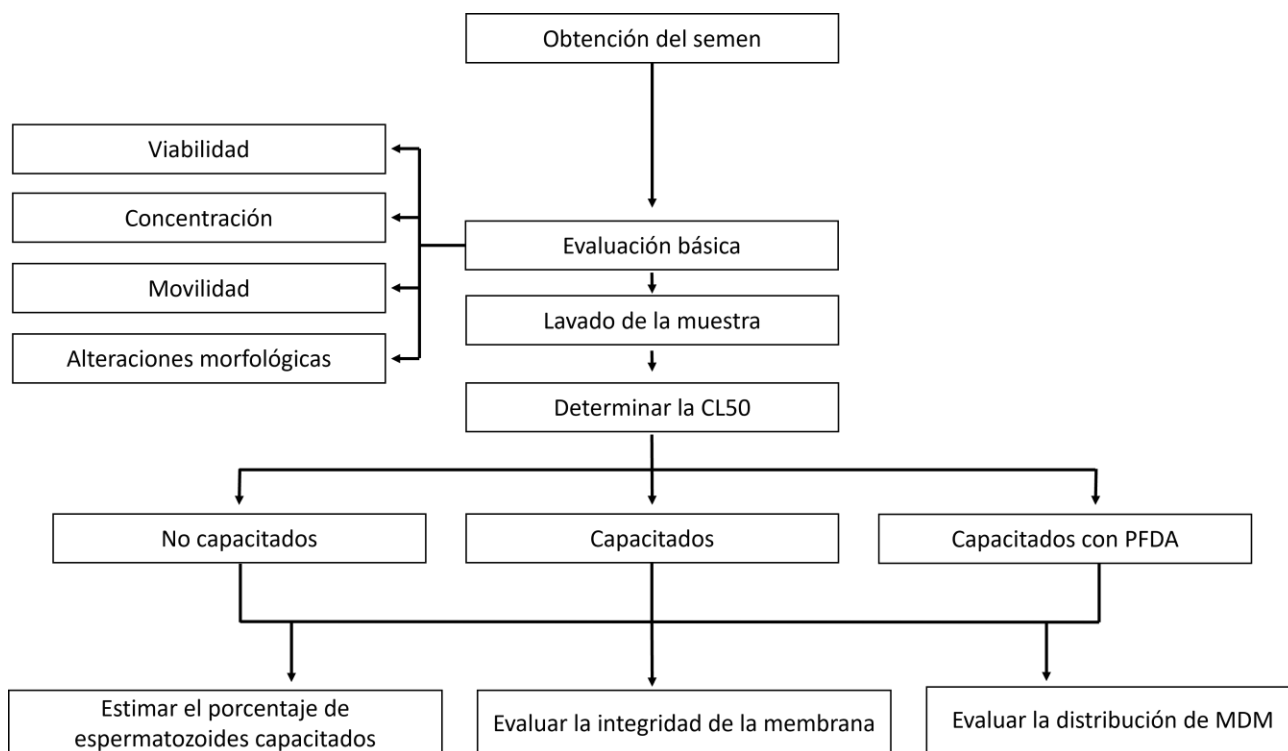
## **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto que produce el PFDA en la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo durante la capacitación *in vitro*.

## **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de PFDA.
2. Evaluar el efecto de PFDA en la integridad de la membrana plasmática.
3. Determinar el efecto de concentraciones subletales de PFDA en:
  - a) El porcentaje de espermatozoides capacitados.
  - b) El patrón de distribución de MDM.

## 8. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 9. MÉTODOS

### 9.1 Muestras de semen

Se utilizaron eyaculados de cerdos de raza Duroc, de la granja “Mejoramiento Genético Pigar”, las cuales se transportaron al laboratorio para su procesamiento, en un termo de plástico de doble pared con aislamiento de poliuretano para evitar la variación de la temperatura durante el tiempo de traslado. Los eyaculados se trataron de manera individual. Para cada condición, se utilizaron cuatro eyaculados de cerdo diferentes y cada experimento se realizó por duplicado.



## 9.2 Evaluación básica

En el laboratorio, se evaluaron los parámetros de viabilidad, concentración, movilidad y alteraciones morfológicas de las muestras de espermatozoides de acuerdo con parámetros establecidos (Garner,1993). Esto con el fin de determinar la calidad de la muestra, lo cual nos permitió eliminar las muestras que no cumplían con los requisitos mínimos de calidad, los cuales son:

- a. Movilidad y viabilidad  $\geq 85 \%$
- b. Concentración  $> 50 \times 10^6$  espermatozoides/mL
- c. No más del 15 % de espermatozoides anormales

La mortalidad se cuantificó con la tinción de eosina-nigrosina. Se realizaron frotis colocando en un portaobjetos 10  $\mu$ L de muestra espermática más 10  $\mu$ L del colorante eosina-nigrosina. Posteriormente se analizaron mediante microscopía óptica y se contaron 200 espermatozoides. Se calculó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, considerando vivos los transparentes, y muertos los que presentaron una coloración rosada; con los mismos frotis se evaluaron las alteraciones en la morfología espermática, se analizaron 200 espermatozoides y se determinó el porcentaje de anomalías; la concentración se determinó mediante el uso de un microscopio óptico y una cámara de Neubauer (Jiménez *et al.*, 2003). Se evaluó la movilidad para determinar porcentaje de movimiento progresivo lento, movimiento progresivo rápido, movimiento vibrátil o en círculos, y los inmóviles (Garner, 1993).

### **9.3 Concentración letal media (CL<sub>50</sub>)**

Con el fin de determinar la CL<sub>50</sub>, se capacitaron espermatozoides con PFDA y en el grupo control los espermatozoides se capacitaron sin tóxico. La capacitación se realizó como se describe en el apartado 9.5. Con base en estudios realizados en el laboratorio de Andrología (datos no publicados), se utilizaron las concentraciones de: 150, 300, 500 y 750 µM de PFDA para determinar la CL<sub>50</sub>, mediante el la prueba de regresión Probit (NCSS, 2021).

### **9.4 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática**

Se evaluó mediante la prueba de solución hiposmótica (HOS), según (Ortiz *et al.*, 2022) con modificaciones. Se tomó una alícuota de 50 µL de muestra conteniendo 20x10<sup>6</sup> espermatozoides, se mezcló con 1 mL de citrato de sodio (100 mOsm) y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se fijaron con formaldehído- glutaraldehído 3 y 0.2% (v/v). Se realizó el conteo clasificando de acuerdo con los siguientes criterios de acuerdo a la clasificación: 1) el enrollamiento e hinchazón del flagelo se consideran vivos ya que reaccionan al cambio osmótico del medio y se les denomina HOS+ y 2) la ausencia de respuesta indica daño a la membrana y se les denomina HOS- y se consideran espermatozoides muertos (Šichtai *et al.* 2019).

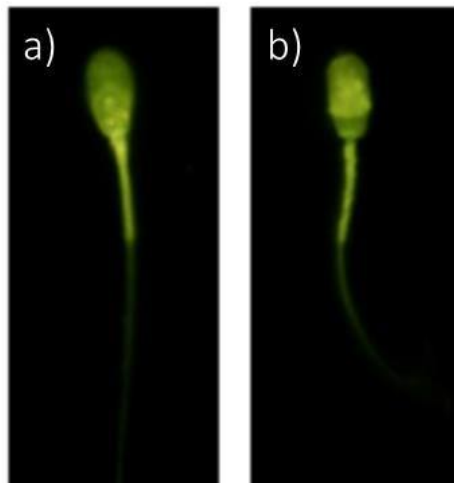
### **9.5 Capacitación *in vitro***

Una vez lavados los espermatozoides mediante centrifugación por 5 minutos a 600 g con solución salina de fosfatos, se incubaron 25 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL en un frasco de cultivo (Nunc, Roskilde Denmark) conteniendo 1 mL de medio de capacitación TALP-HEPES (Tyrode-Albúmina-Lactato-Piruvato) (114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.0 mM

CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 10 mM lactato de sodio, 0.1 mM piruvato de sodio). El día de uso, se suplementó el medio con 6 mg/mL BSA fracción V y 1 mM de Piruvato de Sodio, pH de 7.4 (Jiménez *et al.*, 2003). Se incubaron durante 4 horas a 38°C, en una atmósfera húmeda y 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> (Jiménez *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2006).

La eficiencia del proceso de capacitación se evaluó por medio de la tinción con clortetraciclina (CTC). Se analizaron 200 células y se clasificaron de acuerdo con los patrones de fluorescencia ya establecidos (Kwon *et al.*, 2018) (Figura 8):

- a. espermatozoides no capacitados (NC) aquellos que presentaron fluorescencia intensa en toda la cabeza y pieza media del flagelo.
- b. espermatozoides capacitados aquellos que presentaron fluorescencia intensa en el acrosoma y en la pieza media del flagelo.



**Figura 8.** Imágenes representativas de los patrones con la tinción de CTC en espermatozoides de cerdo. A) sin capacitar (NC), b) capacitados (C). Tomada y editada de (Kwon *et al.*, 2018).

## **9.6 Tratamiento con PFDA**

Los espermatozoides se incubaron durante el periodo de capacitación con concentraciones de PFDA:  $\frac{1}{5}CL_{50}$  (73  $\mu$ M),  $\frac{1}{2} CL_{50}$  (181  $\mu$ M) y  $CL_{50}$  (362  $\mu$ M).

## **9.7 Evaluación de la distribución de MDM**

Se fijaron los espermatozoides con formaldehído durante 30 minutos al 3 % (v / v) y glutaraldehído al 0.2 % (v / v), y se hizo un lavado con agua destilada. Se colocaron alícuotas de  $20 \times 10^6$  células/mL en portaobjetos y se dejaron secar durante 12 horas. Una vez secos, se permeabilizaron con PBS-Tritón al 0.1 % durante 20 min. Después de tres lavados de PBS, se incubaron durante 12 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-flotilina 1 (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, #cat: sc-13313) en solución de bloqueo (BSA al 1 % en PBS). Los portaobjetos se incubaron durante 2 horas a 37°C con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (1:50), se lavaron y se analizaron mediante el microscopio de fluorescencia (Ortiz *et al*, 2022).

## **9.8 Análisis estadístico**

Cada parámetro se analizó con la prueba estadística ANOVA seguida de una prueba de TUKEY para evaluar si existen diferencias significativas entre grupos experimentales, así como entre grupos control y los grupos experimentales. En el caso de la concentración letal media, se utilizó la prueba de regresión PROBIT (Finney, 1952).

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Efecto del PFDA en la mortalidad espermática

En la figura 9 se observa la mortalidad de espermatozoides expuestos a PFDA, a 150 y 300  $\mu\text{M}$  se incrementó la mortalidad sin ser estadísticamente significativas con respecto a los controles 22% contra 34 y 36% respectivamente. Cuando se incubaron con 500 y 750  $\mu\text{M}$  de PFDA la mortalidad se incrementó de manera significativa con respecto a los controles, 43 y 88% con 500  $\mu\text{M}$  y 750  $\mu\text{M}$  respectivamente. Estos resultados indican que a mayor concentración de PFDA, mayor proporción de espermatozoides muertos.

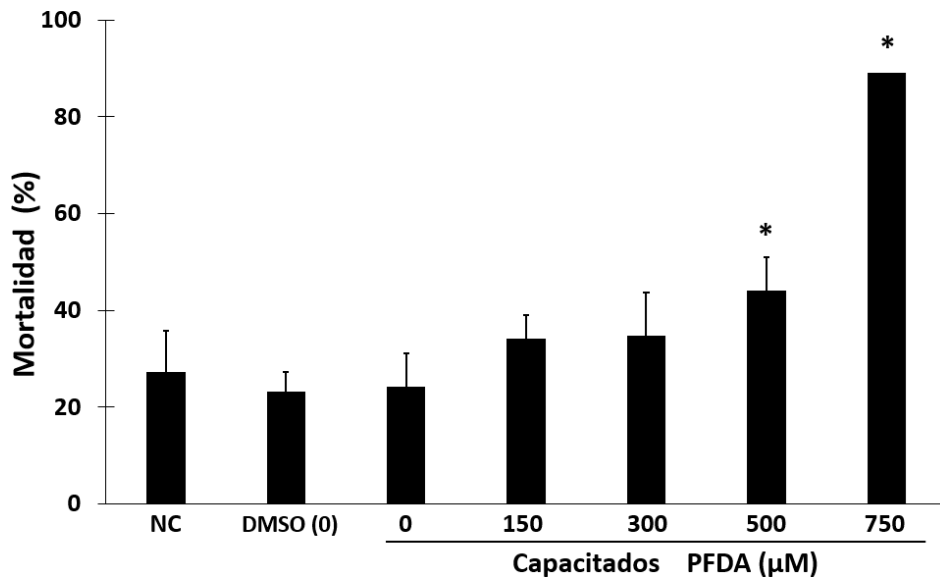


Figura 9. Efecto de PFDA sobre la mortalidad de espermatozoides de cerdo. ANOVA, post hoc Tukey. \* Corresponden a diferencias significativas con respecto al grupo control (0  $\mu\text{M}$ ),  $p < 0.05$ ; media  $\pm$  DE;  $n = 4$  por duplicado. NC= no capacitados; DMSO= dimetilsulfóxido (diluyente del PFDA); PFDA= ácido perfluorodecanoico.

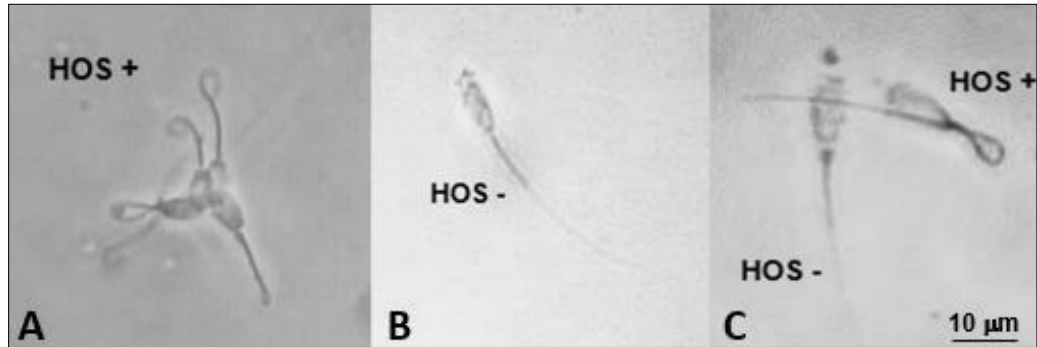
Con estos resultados, se calculó la CL<sub>50</sub>, mediante la regresión PROBIT para modelar variables dicotómicas o binarias, obteniéndose un valor de 361.6 µM con límite inferior de 274 y superior de 457 µM (Tabla 1). La regresión PROBIT, es una prueba fundamental en toxicología, su aproximación se justifica cuando la variación de respuesta puede racionalizarse como una distribución log normal de tolerancias entre los sujetos de la prueba, donde la tolerancia de un sujeto particular es justo la dosis suficiente para la respuesta de interés (Brownlee *et al.*, 1952).

Probabilidad	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.450	292.661	195.925	379.913
.500	361.605	274.052	457.594
.550	430.550	344.848	542.606

Tabla 1. CL<sub>50</sub> (µM) de PFDA en espermatozoides de cerdo calculada por el programa PROBIT.

### 10.2 Efecto del PFDA en la integridad de la membrana plasmática

En la figura 10 se muestran imágenes representativas de los patrones característicos de la prueba hiposmótica, clasificados como HOS +/- . En la figura 10A se observan espermatozoides con un enrollamiento marcado al final del flagelo, así como flagelo hinchado; en la figura 10B se muestra un espermatozoide sin ningún tipo de enrollamiento o hinchazón en el flagelo, lo cual denota daño a membrana plasmática pues ya no hay flujo osmótico al interior; en la figura 10C se observa un espermatozoide con HOS+ mostrándose otro tipo de enrollamiento, comenzando ahora desde la pieza media, y también se observa un espermatozoide con HOS- con un flagelo sin enrollamiento el cual tiene dañada la membrana plasmática.



**Figura 10. Patrones característicos de la prueba hiposmótica. A: HOS+: espermatozoides con flagelo enrollado (sin daño en membrana plasmática); B: HOS- espermatozoides con flagelo no enrollado (con daño en membrana plasmática); C: espermatozoides con HOS+ y HOS-.**

Se hizo un arreglo dosis-respuesta obteniendo la proporción de espermatozoides con daño a membrana plasmática con PFDA a concentraciones de 150, 300, 500 y 750  $\mu\text{M}$ . Se observó que el daño se incrementó significativamente con respecto al control desde 150  $\mu\text{M}$ , 27% de espermatozoides con membrana plasmática dañada, incrementando de manera paulatina conforme se aumentó la concentración dañando 51, 61, y hasta 86% con 300, 500 y 750  $\mu\text{M}$  de PFDA respectivamente (Figura 11).

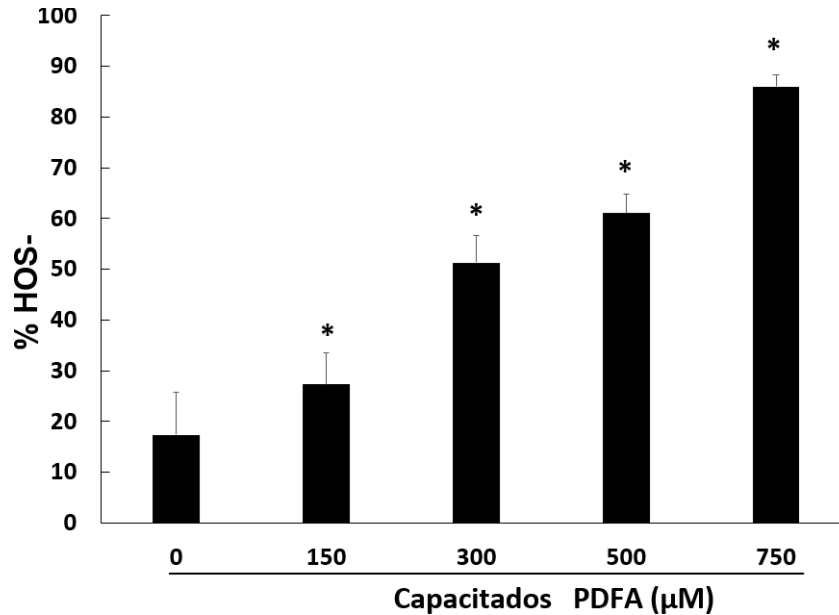


Figura 11. Prueba hiposmótica en espermatozoides de cerdo tratados con diferentes concentraciones de PFDA. HOS- porcentaje de espermatozoides con daño de la membrana plasmática producido por PFDA. ANOVA, post hoc Tukey. \* Corresponden a diferencias significativas con respecto al grupo control (0 μM),  $p < 0.05$ ; media  $\pm$  DE;  $n=4$  por duplicado. PFDA= ácido perfluorodecanoico.

### 10.3 Efecto del PFDA en la capacitación espermática

En la figura 12 se muestra el efecto del PFDA en la capacitación, el grupo control (0 μM) alcanzó 66% espermatozoides que lograron realizar la capacitación. Se aprecia que el proceso de capacitación disminuyó de manera significativa cuando los espermatozoides fueron tratados con concentraciones subletales de PFDA (73, 181 y 362 μM), de tal manera que solo se capacitaron 26, 39 y 29%, respectivamente. Esto muestra que hubo una disminución considerable en cuanto a la eficiencia del proceso de capacitación, el cual bajó a casi la mitad respecto al grupo control.



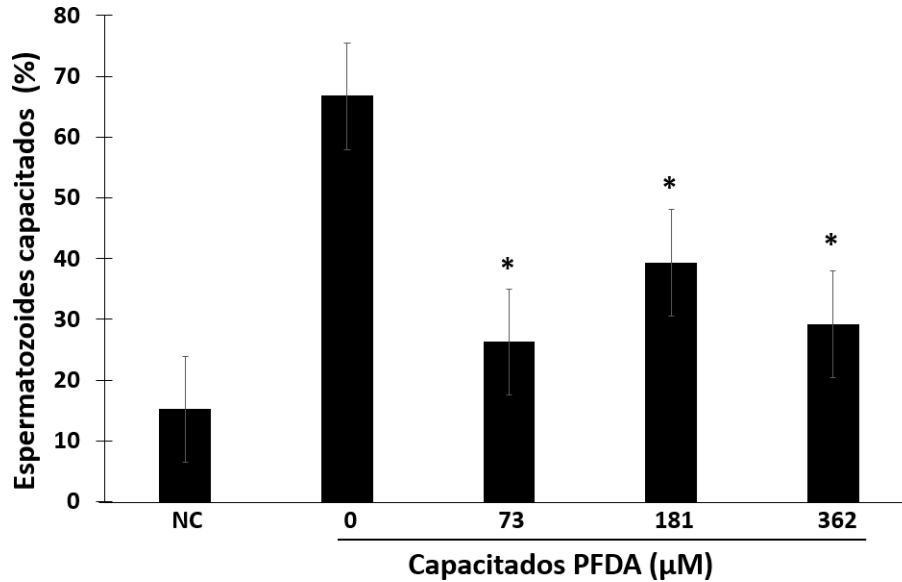


Figura 12. Porcentaje de espermatozoides de cerdo capacitados en presencia de PFDA. ANOVA, post hoc Tukey. \* Corresponden a diferencias significativas con respecto al grupo control (0 µM),  $p < 0.05$ ; media  $\pm$  DE; n=4 por duplicado. NC= no capacitados; PFDA=ácido perfluorodecanoico.

#### 10.4 Efecto del PFDA en la distribución de microdominios de membrana

Los espermatozoides se capacitaron en presencia de concentraciones subletales de PFDA (73, 181 y 362 µM) y se reveló flotilina-1 usando un anticuerpo anti-flotilina-1, debido a que la Flotilina 1 se utiliza como marcador para microdominios de membrana.

Se observaron cinco patrones de fluorescencia (Figura 13):

Patrón 1: fluorescencia homogénea en toda la región acrosomal.

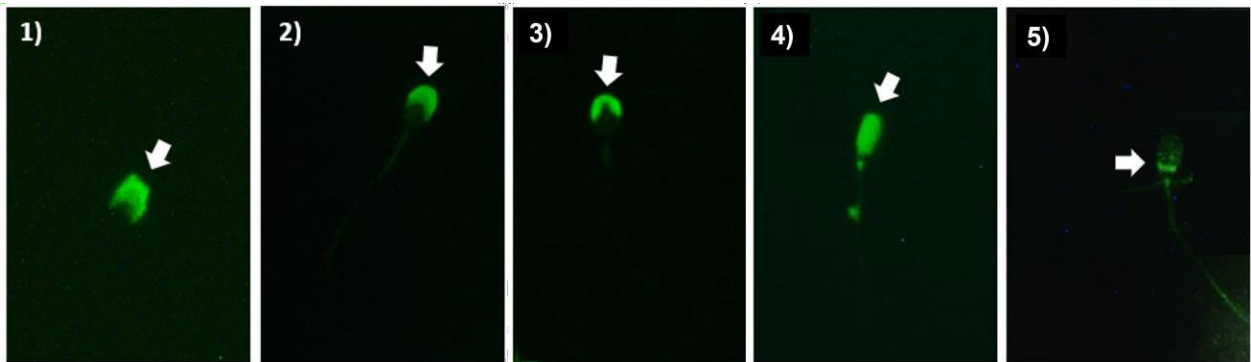
Patrón 2: fluorescencia en la parte anterior del acrosoma.

Patrón 3: fluorescencia intensa en la región apical del acrosoma presentando (corona).

Patrón 4: fluorescencia homogénea en toda la cabeza.

Patrón 5: fluorescencia en la región post-acrosomal.

Una vez que fueron identificados los patrones de fluorescencia, con estos mismos datos se determinó la proporción de espermatozoides que presentaron cada uno de los patrones. En el grupo de espermatozoides no capacitados predominaron los patrones 1 y 2 con el 33 y 30%, respectivamente, así mismo, en el grupo de capacitados sin PFDA podemos observar que el patrón predominante fue el 3 con un 42%. Por otro lado, en los tres grupos tratados con PFDA a diferentes concentraciones (73, 181 y 362  $\mu\text{M}$ ) hubo predominancia de los patrones 1 y 2, así como una disminución en el patrón 3 con 26, 25 y 21%, respectivamente con respecto al grupo control de capacitados. Como se observa, en los grupos tratados con PFDA los MDM se distribuyeron con mayor frecuencia en las zonas características de espermatozoides no capacitados, lo cual nos permite proponer que la distribución de los MDM se ve alterada en presencia de PFDA (Figuras 13 y 14).



**Figura 13. Patrones de fluorescencia en espermatozoides de cerdo en presencia de concentraciones subletales de PFDA (73, 181 y 362  $\mu\text{M}$ ). Los microdominios se evaluaron mediante localización con flotilina-1. 1) Fluorescencia homogénea en toda la región acrosomal; 2) Fluorescencia en la parte anterior del acrosoma; 3) Fluorescencia intensa en la región apical del acrosoma; 4) Fluorescencia homogénea en toda la cabeza; 5) Fluorescencia en la región post-acrosomal.**

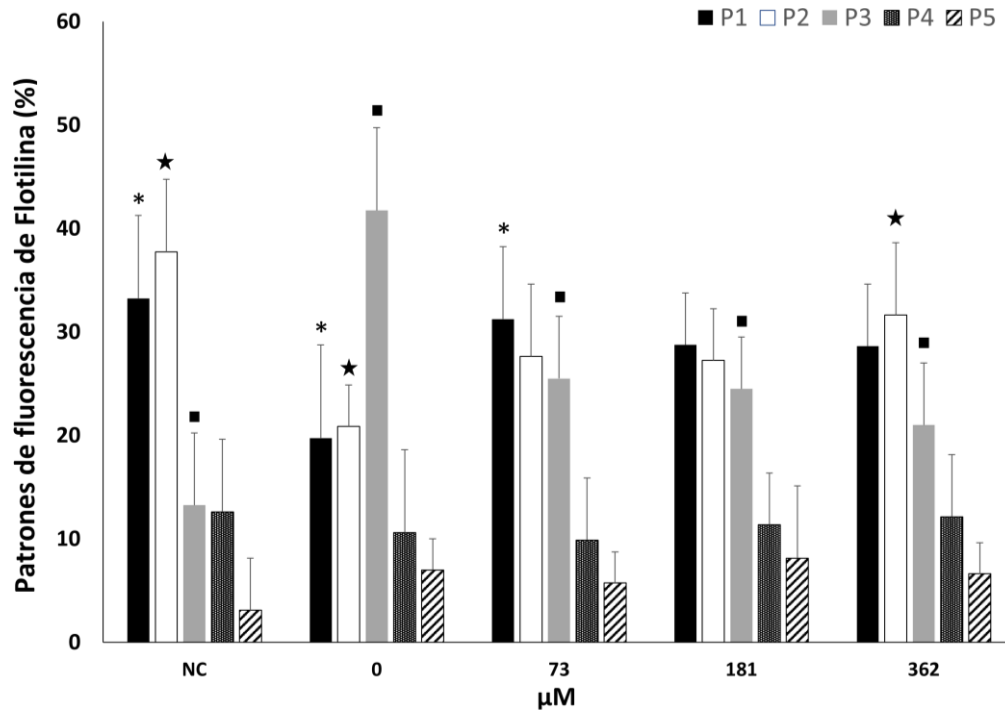


Figura 14. Porcentaje de frecuencia de patrones en espermatozoides de cerdo capacitados en presencia y ausencia de PFDA. ANOVA, post hoc Tukey \* ★ ■ Corresponden a diferencias significativas con respecto al grupo control (0 μM),  $p < 0.05$ ; media  $\pm$  DE; n=4 por duplicado. NC= no capacitados; PFDA= ácido perfluorodecanoico.

## 11. DISCUSIÓN

En el caso de una muestra de semen porcino, para que sea clasificada como normospérmica, debe tener una mortalidad menor del 20% (Alkmin *et al.*, 2013). Dada la similitud del espermatozoide de cerdo con el de humano, es importante mencionar que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), para que una muestra sea considerada como normospérmica no debe sobrepasar un 42% de espermatozoides muertos (WHO, 2021). En este trabajo los espermatozoides capacitados (grupo control) presentaron 24% de mortalidad, valor aceptable dentro de los rangos establecidos. Sin embargo, al tratarlos con PFDA la mortalidad se incrementó de manera dependiente de la concentración hasta 43% con 500  $\mu\text{M}$  y 88% en 750  $\mu\text{M}$ . Estos resultados concuerdan con un estudio en el cual se evalúa el efecto de dos compuestos perfluorados diferentes (PFOA y PFOS) en la mortalidad de espermatozoides de cerdo, en donde reportan mortalidades del 76% con 2500  $\mu\text{M}$  de PFOA y hasta 97% a 3000  $\mu\text{M}$  de PFOS (Ortiz *et al.*, 2022). En otro estudio realizado por Oseguera y colaboradores (2020), se reportaron mortalidades altas que van del 75% al 85% utilizando PFOS 1000  $\mu\text{M}$  y PFHxS 2500  $\mu\text{M}$  (Oseguera *et al.*, 2020).

La concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$ ) de PFDA fue de 362  $\mu\text{M}$ . De acuerdo con Roldán (2016), la Dosis Letal Media es aquella dosis de xenobiótico que causa la muerte de la mitad de la población experimental de organismos en estudios *in vivo*. Debido a que nosotros realizamos estudios *in vitro*, el valor toxicológico es la concentración del compuesto en el medio de incubación. Boujrad y colaboradores (2000) mencionan que los compuestos perfluorados aumentan su toxicidad cuantos más carbonos tenga su cadena. En este caso, PFDA tiene mayor número de carbonos en su cadena (10).

en comparación con PFOS (8), PFHxS (6) y PFOA (8). Por lo que, podemos proponer que la toxicidad de PFDA en espermatozoides de cerdo es mayor en comparación con otras PFAS.

Esta aseveración coincide al comparar las  $CL_{50}$  de otros estudios ya reportados con PFOS, PFHxS y PFOA en espermatozoides de cerdo, en los que la  $CL_{50}$  fue de 460  $\mu$ M, 1930  $\mu$ M y 1894  $\mu$ M, respectivamente (Oseguera *et al.*, 2020; Ortiz *et al.*, 2022). Al comparar la  $CL_{50}$  de PFDA con la de estos compuestos perfluorados, podemos observar que, efectivamente la de PFDA es menor, es decir, se necesita menos cantidad de PFDA para generar toxicidad. Esto también lo podemos confirmar haciendo una comparación con la mortalidad de este estudio con los estudios mencionados anteriormente ya que, para obtener un resultado de mortalidad estadísticamente significativo se requirieron concentraciones de 1000  $\mu$ M de PFOS, 1500  $\mu$ M de PFOA y 2500  $\mu$ M de PFHxS (Oseguera *et al.*, 2020; Ortiz *et al.*, 2022), en cambio en el presente estudio con PFDA se requirió únicamente una concentración de 500  $\mu$ M para provocar daño a la célula.

La prueba hiposmótica o también denominada endósmosis, permite estimar la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides. Se considera anormal para la fertilidad una muestra con un 60% o más de espermatozoides con daño membranal, evidenciado mediante la prueba hiposmótica (Zubair *et al.*, 2015). En dos de los tres grupos tratados con PFDA se obtuvieron porcentajes más altos que los aceptados (61 y 85%) a concentraciones de 500 y 750  $\mu$ M, respectivamente, por lo que se observó que, conforme aumentan las concentraciones de PFDA, aumenta el daño a membrana plasmática. Estas conclusiones coinciden con los resultados

obtenidos al evaluar su efecto sobre la mortalidad de los espermatozoides. Por otro lado, el daño a membrana provocado por PFDA coincide con los resultados mostrados por Ortiz y colaboradores (2022) en donde evalúan el efecto de otros compuestos perfluorados (PFOS y PFOA), reportando afectaciones en la funcionalidad de la membrana de espermatozoides de cerdo con un 47% y 49% de daño a membrana con 274  $\mu\text{M}$  de PFOS y 950  $\mu\text{M}$  de PFOA, respectivamente.

Se ha demostrado que espermatozoides que no presentan hinchazón ni enrollamiento del flagelo es porque no tuvieron la capacidad de reaccionar a un ambiente hiposmótico, lo que revela una evidente falta de funcionalidad en la membrana (Cabrita *et al.*, 1999). Este efecto se ha asociado con disfunciones de las proteínas de la cabeza, pieza media y flagelo, afectando por consecuencia la calidad y función espermática y, por tanto, la fecundación (Jeyendran *et al.*, 1984). En el caso de los patrones que encontramos en la prueba positiva hiposmótica, coinciden con los reportados por Jeyendran (1984), donde se muestra una representación esquemática de cambios morfológicos típicos en espermatozoides humanos sujetos a estrés hiposmótico, así como Comercio y colaboradores (2013), en las especies canina y felina, y Ortiz y colaboradores (2022) en cerdo.

Desde el descubrimiento de la capacitación espermática, se han desarrollado varios métodos para caracterizar este complejo proceso biológico. De acuerdo con Ded y colaboradores (2019), la tinción de CTC es un método para determinar el proceso de capacitación en espermatozoides de cerdo *in vitro*. La capacitación es esencial para el éxito de la unión del espermatozoide al ovocito y, por tanto, de la fecundación, por lo que su alteración o inhibición puede afectar de manera negativa la fertilidad.

De acuerdo con nuestros resultados, el grupo control (capacitado sin PFDA) tuvo una eficiencia de capacitación del 66%. En el caso de todos los grupos experimentales a los que se les agregó PFDA a diferentes concentraciones (73, 181 y 362  $\mu\text{M}$ ), se encontró una disminución en el número de espermatozoides que lograron realizar la capacitación. Estos resultados coinciden con dos estudios realizados en 2020 y 2022 en los que evalúan el efecto de otros compuestos perfluorados (PFOS y PFOA) en el proceso de capacitación (Oseguera *et al.*, 2020 y Ortiz *et al.*, 2022), es decir, también disminuyeron el número de espermatozoides capacitados.

En el proceso de capacitación la membrana plasmática pasa por una serie de modificaciones entre las que destacan el reordenamiento de proteínas, lípidos, microdominios de membrana, así como el flujo de iones, para desencadenar vías de señalización (Gadella *et al.*, 2008).

Si relacionamos la proporción baja de espermatozoides que se capacitan en presencia de PFDA, así como nuestros resultados de mortalidad y daño a membrana, podemos sugerir que este proceso se está alterando debido a que el PFDA está afectando la membrana plasmática del espermatozoide. Uno de los eventos esenciales para que se logre la capacitación es la pérdida de colesterol. El eflujo del colesterol favorece entre otras cosas, que la membrana sea más dinámica perdiendo su rigidez, promoviendo la translocación de algunas proteínas a la zona ecuatorial, donde son necesarias para que el espermatozoide posteriormente pueda adherirse al ovocito (Gadella *et al.*, 2008). En un estudio *in silico* se reportó que algunos compuestos perfluorados tienen las propiedades fisicoquímicas necesarias para tender a incrustarse “como agujas” en la bicapa lipídica, provocando que tenga más espesor y

sea más compacta generando un efecto similar al del colesterol (Shen *et al.*, 2020), debido a esto, el efecto es la falta de fluidez y de intercambio de moléculas que son esenciales para el proceso de capacitación (Figura 15).

En el espermatozoide, la arquitectura lipídica de la membrana plasmática juega un papel importante para la adquisición de la capacidad fecundante. Hay evidencia de que las membranas de los espermatozoides contienen microdominios que forman balsas lipídicas (López *et al.*, 2020), mismos que van a sufrir cambios en su distribución espacial durante el proceso de capacitación (Selvaraj *et al.*, 2006). Existen proteínas reportadas como proteínas implicadas en la formación de microdominios de membrana entre las que se encuentran las flotilinas. La familia de flotilinas está compuesta por dos miembros homólogos (flotilina-1 y flotilina-2), que se conservan evolutivamente (Guzmán *et al.*, 2019), y se ha reportado su presencia en espermatozoides de cobayo y de cerdo (Maldonado *et al.*, 2017; Van Gestel *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2022). En espermatozoides de cerdo, se ha detectado flotilina en la membrana plasmática sobre el acrosoma (Van Gestel *et al.*, 2005).

En el presente estudio, los grupos control de espermatozoides no capacitados, presentaron una distribución homogénea en toda la región acrosomal y en el grupo de espermatozoides a los que se les indujo la capacitación, la distribución dominante fue la que se presentó en la cresta apical de la cabeza del espermatozoide, ambos patrones coinciden con lo reportado por otros autores (Maldonado *et al.*, 2017; Van Gestel *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2022). Se ha demostrado que la localización de las balsas lipídicas en la zona apical es importante porque participa posteriormente en el reconocimiento de la ZP (Boerke *et al.*, 2008).



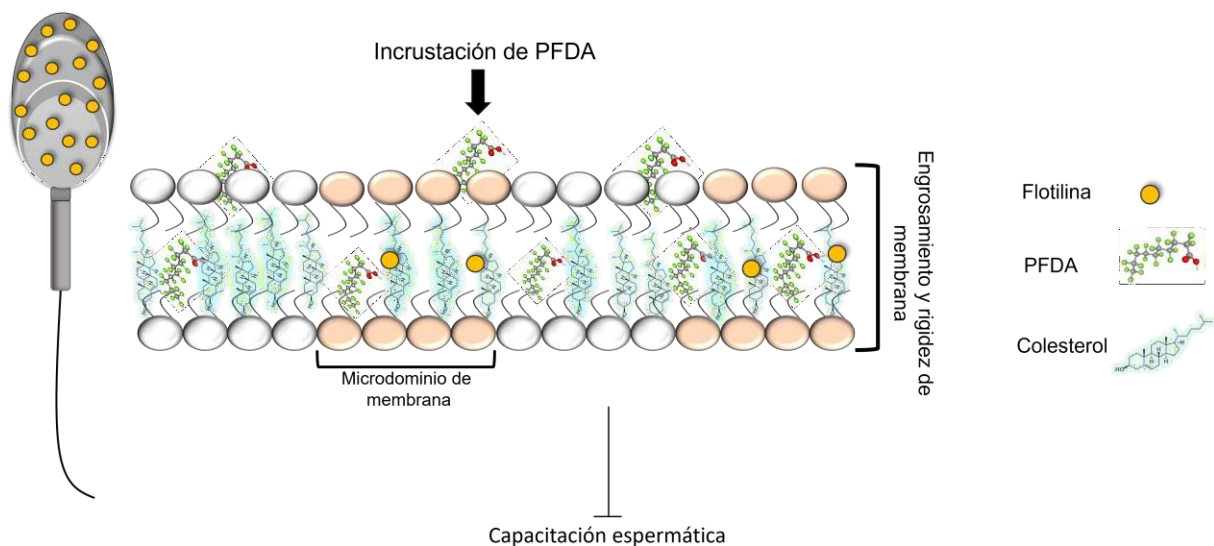
En los espermatozoides capacitados en presencia de PFDA, la distribución dominante fue homogénea en todo el acrosoma, específica para espermatozoides no capacitados. De acuerdo con estos resultados se propone que el PFDA está impidiendo el reordenamiento adecuado de la flotilina-1, marcador de los MDM en condiciones de capacitación *in vitro*.

Se ha demostrado que la pérdida de colesterol estabiliza la estructura de las balsas lipídicas provocando cambios en su tamaño, distribución y contenido de glicoproteínas (Kabouridis *et al.*, 2000). En este caso, podemos proponer que la poca o nula movilidad de los MDM en los grupos tratados con PFDA, podría ser resultado de una compactación de la membrana plasmática como mencionan Shen y colaboradores (2020) en su estudio *in silico* ya que, al insertarse el PFDA a la membrana, ésta se compacta y no permite el dinamismo requerido entre los MDM durante la capacitación espermática. Es bien sabido que para que exista un reordenamiento adecuado de MDM se necesita que la membrana plasmática aumente su fluidez. En el presente estudio se presentó hasta un 89% de daño membranal en grupos tratados con PFDA, por lo que podemos sugerir que el PFDA no está permitiendo que ocurran los eventos necesarios para que suceda una distribución correcta de los MDM (Figura 15).

Los resultados observados en este trabajo dejan evidencia clara de que el proceso de capacitación es alterado ante la presencia de PFDA, afectando su capacidad fertilizante, sin embargo, aún queda un amplio campo de investigación para esclarecer los mecanismos de acción.

En la Figura 15 se presenta el modelo propuesto de daño a membrana de PFDA sobre la membrana y el proceso de capacitación de espermatozoides de cerdo. Con base en

la literatura, se propone que el PFDA se incrusta en la membrana del espermatozoide de manera pasiva, ocupando lugares entre los lípidos de la bicapa lipídica, lo que le dará mayor rigidez y compactación (función parecida a la del colesterol). Como resultado, no habrá la fluidez necesaria para que los MDM se movilen. Así mismo, no se activarán los canales iónicos, por lo que no será posible el intercambio de los iones necesarios para que se dé de manera correcta el proceso de capacitación. Es bien sabido que la pérdida de colesterol es necesaria para que exista fluidez y por lo tanto reordenamiento adecuado de los MDM, de esta manera, si el PFDA está dándole compactación y engrosamiento a la membrana (Shen *et al.*, 2020), esto no va a permitir que se distribuyan en el lugar necesario para que realicen su función.



**Figura 15. Modelo propuesto de daño a membrana de PFDA sobre la membrana y el proceso de capacitación de espermatozoides de cerdo.**

## 12. CONCLUSIONES

Se determinó la concentración letal media de PFDA en espermatozoides de cerdo *in vitro*, la cual resultó ser menor a la reportada para PFOS y casi cinco veces menor que la reportada para PFHxS y PFOA, es decir, es más tóxico.

A concentraciones subletales, este compuesto altera la fisiología de la membrana plasmática de los espermatozoides.

El daño también repercute en la redistribución de los microdominios de membrana durante la capacitación, y esto se relaciona con la disminución de la eficiencia de los espermatozoides para realizar el proceso de capacitación, el cual es indispensable para que el espermatozoide realice la reacción acrosomal y logre fecundar al óvulo.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, B. H., & Olsen, G. W. (2007). Bladder cancer in perfluorooctanesulfonyl fluoride manufacturing workers. *Annals of epidemiology*, 17(6), 471-478.
- Alkmin, D. V., Martínez-Alborcia, M. J., Parrilla, I., Vázquez, J. M., Martínez, E. A., & Roca, J. (2013). The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology*, 79(9), 1294-1300.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 199-225.
- ATSDR. 2015. "Resumen de salud pública perfluoroalquilos." <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>. Bainbridge, R. E. y A. E. Carlson. 2019. "Tiny Dancer: EFCAB9 Triggers Sperm Hyperactivation via CatSper." *Trends Biochem Sci* 44 (10):823-826. doi: 10.1016/j.tibs.2019.08.001
- Boerke, A., Tsai, P., Garcia-Gil, N., Brewis, I., & Gadella, B. (2008). Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*, 70(8), 1188-1196.
- Bookstaff, R. C., Moore, R. W., Ingall, G. B., & Peterson, R. E. (1990). Androgenic deficiency in male rats treated with perfluorodecanoic acid. *Toxicology and applied pharmacology*, 104(2), 322-333.
- Borges, T., Glauert, H. P., & Robertson, L. W. (1993). Perfluorodecanoic acid noncompetitively inhibits the peroxisomal enzymes enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Toxicology and applied pharmacology*, 118(1), 8-15.
- Boujrad, N., Vidic, B., Gazouli, M., Culty, M., & Papadopoulos, V. (2000). The peroxisome proliferator perfluorodecanoic acid inhibits the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) expression and hormone-stimulated mitochondrial cholesterol transport and steroid formation in Leydig cells. *Endocrinology*, 141(9), 3137-3148.
- Cabrita E, Álvarez R, Anel E, Herraes MP (1999) The hypo osmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Anim Reprod Sci* 55:279–287.

- Calafat, A. M., Kato, K., Hubbard, K., Jia, T., Botelho, J. C., & Wong, L.-Y. (2019). Legacy and alternative per-and polyfluoroalkyl substances in the US general population: Paired serum-urine data from the 2013–2014 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environment international*, 131, 105048.
- Campbell, M., Iyer, P., Kaufman, F., Kim, A., Li, L.-H., Moran, F., & Niknam, Y. (2021). Evidence on the Male Reproductive Toxity of Perfluorononanoic Acid (PFNA) and Its Salts and Perfluorodecanoic Acid (PFDA) and Its Salts. *Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch*, 76-87.
- Cassone, C. G., Vongphachan, V., Chiu, S., Williams, K. L., Letcher, R. J., Pelletier, E., Crump, D., & Kennedy, S. W. (2012). In ovo effects of perfluorohexane sulfonate and perfluorohexanoate on pipping success, development, mRNA expression, and thyroid hormone levels in chicken embryos. *Toxicological Sciences*, 127(1), 216-224.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2022). Resumen de compuestos de PubChem para CID 9555, ácido perfluorodecanoico. Recuperado el 25 de septiembre de 2022 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perfluorodecanoic-acid>.
- Comercio, E., Monachesi, N., Loza, M., Gambarotta, M., & Wanke, M. (2013). Hypo-osmotic test in cat spermatozoa. *Andrologia*, 45(5), 310-314.
- Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Glüge, J., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., Ng, C. A., Scheringer, M., & Wang, Z. (2020). The high persistence of PFAS is sufficient for their management as a chemical class. *Environ Sci Process Impacts*, 22(12), 2307-2312. <https://doi.org/10.1039/d0em00355g>
- de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1998). Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulfide groups on human sperm capacitation and superoxide production. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(7), 803-817.
- de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2003). Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(10), 1271-1285.
- Ded, L., Dostalova, P., Zatecka, E., Dorosh, A., Komrskova, K., & Peknicova, J. (2019). Fluorescent analysis of boar sperm capacitation process *in vitro*. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 17(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0554-z>.

- Deng, S.-Z., Xu, C.-L., Xu, Z.-F., Zhou, L.-Y., Xie, S.-J., Wei, K.-N., Jin, Y.-C., Zeng, Z.-C., Yang, X.-J., & Tan, S.-H. (2021). Perfluorodecanoic acid induces meiotic defects and deterioration of mice oocytes *in vitro*. *Toxicology*, *460*, 152884.
- Drinking Water Health Advisories for PFOA and PFOS | US EPA. (2016, May 5). Retrieved September 28, 2022, from US EPA website: <https://www.epa.gov/sdwa/drinking-water-health-advisories-pfoa-and-pfos>
- Erwin L, 2004: Lipid Bilayer Structure. In: William JL, Lane MD (eds), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, New York, pp. 576–579.
- Fei, C., McLaughlin, J. K., Lipworth, L., & Olsen, J. (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Human reproduction*, *24*(5), 1200-1205.
- Finney, D. J. (1952) Probit analysis a statistical treatment of the sigmoid response curve. 2d ed. *University Press*, Cambridge, England.
- Gadella, B. M., Tsai, P.-s., Boerke, A., & Brewis, I. A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International journal of developmental biology*, *52*(5-6), 473-480.
- Garner, D. (1993). HAFEZ ESE: *Spermatozoa and seminal plasma. Reproduction in farm animals (Eds) ESE Hafez 6th Lea and Febiger. Philadelphia, 1993.*
- Gibson, N. J., Tolbert, L. P., & Oland, L. A. (2009). Roles of specific membrane lipid domains in EGF receptor activation and cell adhesion molecule stabilization in a developing olfactory system. *PLoS One*, *4*(9), e7222.
- Giesy, J. P., & Kannan, K. (2001). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environmental science & technology*, *35*(7), 1339-1342.
- Guzmán-Flores, J. E., Georgellis, D., & Álvarez, A. F. (2019). Microdominios membranales bacterianos semejantes a balsas lipídicas. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, *22*.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2013). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., & Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *The Journal of cell biology*, *141*(4), 929-942.

- Hidalgo Ordóñez, C. O., Tamargo Miguel, C., & Díez Monforte, C. (2005). Análisis del semen bovino.
- Hundley, S., Sarrif, A., & Kennedy Jr, G. (2006). Absorption, distribution, and excretion of ammonium perfluorooctanoate (APFO) after oral administration to various species. *Drug and chemical toxicology*, 29(2), 137-145.
- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., & Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219-228.
- Jiménez, I., Fierro, R., González-Márquez, H., Mendoza-Hernández, 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. *Archives of andrology*, 52(6), 455-462.
- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R. o., Herrera, J. A., García, A, Betancourt, M., & Fierro, R. (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59(5-6), 1171-1180.
- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Betancourt, M., Herrera, J., & Fierro, R. (2002). Expression of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boars by flow cytometry. *Archives of andrology*, 48(2), 159-166.
- Joensen, U. N., Bossi, R., Leffers, H., Jensen, A. A., Skakkebaek, N. E., & Jørgensen, N. (2009). ¿Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect*, 117(6), 923-927. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800517>
- Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L., & Ley, S. C. (2000). Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *European journal of immunology*, 30(3), 954-963.
- Kawano, N., Yoshida, K., Miyado, K., & Yoshida, M. (2011). Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *Journal of lipids*, 2011.
- Kissa, E. (2001). Fluorinated surfactants and repellents (Vol. 97). CRC Press.
- Kwon, W.-S., Shin, D.-H., Ryu, D.-Y., Khatun, A., Rahman, M. S., & Pang, M.-G. (2018). Applications of capacitation status for litter size enhancement in various pig breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(6), 842.

- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., & Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences*, 99(2), 366-394.
- Lehmler, H.-J. (2005). Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants—a review. *Chemosphere*, 58(11), 1471-1496.
- Long, M., Ghisari, M., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2013). Effects of perfluoroalkyl acids on the function of the thyroid hormone and the aryl hydrocarbon receptor. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 8045-8056.
- López-Salguero, J. B., Fierro, R., Michalski, J.-C., Jiménez-Morales, I., Lefebvre, T., Mondragón-Payne, O., Baldini, S. F., Vercoutter-Edouart, A.-S., & González-Márquez, H. (2020). Identification of lipid raft glycoproteins obtained from boar spermatozoa. *Glycoconjugate journal*, 37, 499-509.
- Lucio, LJ (2003). Balsas lipídicas: poner orden en el caos. *Revista de investigación de lípidos*, 44 (4):655-667.
- Maldonado-García, Deneb, Mónica L. Salgado-Lucio, Ana L. Roa-Espitia, Tania Reyes-Miguel y Enrique O. Hernández-González. 2017. "Calpain inhibition prevents flotillin re-ordering and Src family activation during capacitation." *Cell and Tissue Research* 369 (2):395-412. doi: 10.1007/s00441-017-2591-2.
- Maxfield, F. R. (2002). Plasma membrane microdomains. *Current opinion in cell biology*, 14(4), 483-487.
- Meza, U., Romero-Méndez, A. C., Licón, Y., & Sánchez-Armáss, S. (2010). La membrana plasmática: modelos, balsas y señalización. *Revista de Educación Bioquímica*, 29(4), 125-134.
- Meza, U., Romero-Méndez, C., Sánchez-Armáss, S., & Rodríguez-Menchaca, A. (2021). Participación de rafts en enfermedades neurológicas. *Neurología*.
- NCSS, S. S. (2021). Probit Analysis. In L. NCSS (Ed.), NCSS Documentation. NCSS Statistical Software. [https://ncss-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/NCSS/Probit\\_Analysis.pdf](https://ncss-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/NCSS/Probit_Analysis.pdf)  
<https://www.ncss.com/software/ncss/ncss-documentation/#Regression>
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.



- Olson, C. T., & Andersen, M. E. (1983). The acute toxicity of perfluorooctanoic and perfluorodecanoic acids in male rats and effects on tissue fatty acids. *Toxicology and applied pharmacology*, 70(3), 362-372.
- Ortiz-Sánchez, P. B., Roa-Espitia, A. L., Fierro, R., López-Torres, A. S., Jiménez-Morales, I., Oseguera-López, I., Hernández-González, E. O., & González-Márquez, H. (2022). Perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid induce plasma membrane dysfunction in boar spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Reproductive Toxicology*, 110, 85-96.
- Oseguera-López, I., Pérez-Cerezales, S., Ortiz-Sánchez, P. B., Mondragon-Payne, O., Sánchez-Sánchez, R., Jiménez-Morales, I., Fierro, R., & González-Márquez, H. (2020). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorohexane sulfonate (PFHxS) alters protein phosphorylation, increase ROS levels and DNA fragmentation during *in vitro* capacitation of boar spermatozoa. *Animals*, 10(10), 1934.
- Patton, K. T. (2021). *Estructura y función del cuerpo humano*. Elsevier.
- Paul, A. G., Jones, K. C., & Sweetman, A. J. (2009). A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environmental science & technology*, 43(2), 386-392.
- Prevedouros, K., Cousins, I. T., Buck, R. C., & Korzeniowski, S. H. (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental science & technology*, 40(1), 32-44.
- Program, N. T. (2022). NTP Technical Report on the Toxicity Studies of Perfluoroalkyl Carboxylates (Perfluorohexanoic Acid, Perfluorooctanoic Acid, Perfluorononanoic Acid, and Perfluorodecanoic Acid) Administered by Gavage to Sprague Dawley (Hsd: Sprague Dawley SD) Rats (Revised).
- Rahman, M. F., Peldszus, S., & Anderson, W. B. (2014). Behaviour and fate of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in drinking water treatment: A review. *Water research*, 50, 318-340.
- Richterová, D., Govarts, E., Fábelová, L., Rausová, K., Martin, L. R., Gilles, L., Remy, S., Colles, A., Rambaud, L., & Riou, M. (2023). PFAS levels and determinants of variability in exposure in European teenagers—Results from the HBM4EU aligned studies (2014–2021). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 247, 114057.

- Rodríguez Tobón, E., Fierro R., González Márquez, H., Damián Matsumura, P.G., & Arena Ríos, E. (2019). El papel del glutatión reducido (GSH) en el proceso de capacitación espermática. En *El espermaozoide: una mirada desde México*. México: Ed. Scriptus. 136-152.
- Roldán Reyes, E. (2016). Introducción a la toxicología. Universidad Nacional Autónoma de México. 141pp.
- Šabović, I., I. Cosci, L. De Toni, A. Ferramosca, M. Stornaiuolo, A. Di Nisio, S. Dall'Acqua, A. Garolla y C. Foresta. 2019. "Perfluoro-octanoic acid impairs sperm motility through the alteration of plasma membrane." *Journal of Endocrinological Investigation* 43 (5):641-652. doi: 10.1007/s40618-019-01152-0
- Schmitz, G., & Grandl, M. (2008). Update on lipid membrane microdomains. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(2), 106-112.
- Selvaraj, V., Asano, A., Buttke, D. E., McElwee, J. L., Nelson, J. L., Wolff, C. A., Merdiushev, T., Fornés, M. W., Cohen, A. W., & Lisanti, M. P. (2006). Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm. *Journal of Cellular Physiology*, 206(3), 636-646.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(6), 361-374.
- Shen, Z., Ge, J., Ye, H., Tang, S., & Li, Y. (2020). Cholesterol-like condensing effect of perfluoroalkyl substances on a phospholipid bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(26), 5415-5425.
- Shigei, M., Ahrens, L., Hazaymeh, A., & Dalahmeh, S. S. (2020). Per-and polyfluoroalkyl substances in water and soil in wastewater-irrigated farmland in Jordan. *Science of The Total Environment*, 716, 137057.
- Šichtař, Jiří, Filipa Bubeníčková, Jitka Sirohi y Ondřej Šimoník. 2019. "How to Increase Post-Thaw Semen Quality in Poor Freezing Stallions: Preliminary Results of the Promising Role of Seminal Plasma Added after Thawing." *Animals* 9 (7):414. doi: 10.3390/ani9070414.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science*, 175(4023), 720-731.

- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (2008). Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its fourth meeting. Persistent Organic Pollutants Review Committee, Fourth meeting. Geneva, United Nations Environment Program (UNEP).
- Tapia, J., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G., Pena, F., & Aparicio, I. (2012). The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in domestic animals*, 47, 65-75.
- Toft, G., Jönsson, B., Lindh, C., Giwercman, A., Spano, M., Heederik, D., Lenters, V., Vermeulen, R., Rylander, L., & Pedersen, H. (2012). Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in Arctic and European populations. *Human reproduction*, 27(8), 2532-2540.
- Van Gestel, R., Brewis, I., Ashton, P., Helms, J., Brouwers, J., & Gadella, B. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular human reproduction*, 11(8), 583-590.
- Van Rafelghem, M. J., Inhorn, S. L., & Peterson, R. E. (1987). Effects of perfluorodecanoic acid on thyroid status in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 87(3), 430-439.
- Visconti, P.E., G.D. Moore, J.L. Bailey, P. Leclerc, S.A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke y G.S. Kopf (1995b). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP- dependent pathway. *Development*. 121(4):1139-1150.
- Visconti, P.E., J.L. Bailey, G.D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke y G.S. Kopf (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121(4):1129-1137.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva: World Health Organization; 2021.
- Zubair, M., Ahmad, M., & Jamil, H. (2015). Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test. *Andrologia*, 47(7), 744-750.



Efecto del ácido perfluorodecanoico (PFDA) en la membrana de espermatozoides de cerdo durante la capacitación.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 17 del mes de noviembre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN
- DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ
- DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ
- DRA. ANA LILIA ROA ESPITIA

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

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: KARLA GABRIELA PIÑA DE LA ROSA

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

**APROBAR**

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



KARLA GABRIELA PIÑA DE LA ROSA  
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JOSÉ ANTONIO HERRERA BARRAGAN

VOCAL

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL

DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ

SECRETARIA

DRA. ANA LILIA ROA ESPITIA