



División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Maestría en Biología Experimental

**“Estudio del mecanismo de la aglutinación producida por los perfluorados
PFOA y PFOS en los espermatozoides de cerdo
durante la capacitación *in vitro*”**

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental

PRESENTA

Óscar Felipe Mondragón Payne

Matrícula: 2183801534

Comité de tutores

Codirectora: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Codirectora: Dra. Ana Lilia Roa Espitia

Asesor: Dr. Enrique Othón Hernández González

Jurados

Dra. Irma Jiménez Morales

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Dra. Elvia López Pérez

Dr. Enrique Othón Hernández González

Iztapalapa, Ciudad de México, mayo 2021.

Declaración de originalidad

El que suscribe Óscar Felipe Mondragón Payne, alumno del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Estudio del mecanismo de la aglutinación producida por los perfluorados PFOA y PFOS en los espermatozoides de cerdo durante la capacitación *in vitro*”,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante El H. Jurado para lo obtención del grado de Maestría 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 llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, 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 abril de 2021.

Atentamente



Óscar Felipe Mondragón Payne

“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV Unidad Zacatenco y en el Laboratorio de Andrología del Departamento de Ciencias de la Salud, D.C.B.S. de la U.A.M. Unidad Iztapalapa.

Para su realización se recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgado a Óscar Felipe Mondragón Payne para la realización de sus estudios de Posgrado en Biología Experimental nivel Maestría. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 940985 durante el periodo de octubre del 2018 a septiembre de 2020.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis Titulada:

“Estudio del mecanismo de la aglutinación producida por los perfluorados PFOA y PFOS en los espermatozoides de cerdo durante la capacitación *in vitro*”, que presentó Óscar Felipe Mondragón Payne, el 14 de mayo del año 2021.

Miembros del Jurado, Sinodales

Presidenta



Dra. Irma Jiménez Morales. Laboratorio de Andrología, perteneciente al Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S. U.A.M.-I.
e-mail: jimmi@xanum.uam.mx

Secretario



Dr. José Antonio Herrera Barragán. Laboratorio de Fisiología Veterinaria. Departamento de Producción Agrícola y Animal. D.C.B.S. U.A.M.-X.
e-mail: jherrerab@correo.xoc.uam.mx

Vocal 1



Dra. Elvia López Pérez. Profesora-Investigadora del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. e-mail: ELOPEZP@chapingo.mx

Vocal 2



Dr. Enrique Othón Hernández González. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN-Unidad Zacatenco. Departamento de Biología Celular.
e-mail: eoton@cell.cinvestav.mx

Miembros del Comité de tutores

Codirectora interna



Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa

Departamento de Ciencias de la Salud, D.C.B.S.

Tel: 5558046557, e-mail: reyna@xanum.uam.mx

Codirectora externa



Dra. Ana Lilia Roa Espitia

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN-Unidad Zacatenco

Departamento de Biología Celular, Tel: 57473800 Ext: 5571

e-mail: aroa670428@hotmail.com



Dr. Enrique Othón Hernández González

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN-Unidad Zacatenco

Departamento de Biología Celular, Tel: 57473352, e-mail: eoton@cell.cinvestav.mx

Dedicatorias y Agradecimientos

El presente trabajo es dedicado para mi güerita que siempre me ha animado y compartido tiempo de calidad. Así como a mi familia que me animaron y acompañan siempre.

Agradecimiento a mi familia que son una parte valiosa para mí, siempre me apoyan, motivan, etc.

Agradecimiento a los miembros de la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, por su apoyo en todos los procesos que conlleva el pertenecer a este Posgrado.

Agradecimiento a todos los profesores de la maestría que siempre nos cuestionaban sobre lo que necesitábamos saber y hacían investigar lo que no conocíamos.

Agradecimiento a los coordinadores de este Posgrado que me apoyaron en todos los trámites desde el inicio de este Posgrado hasta el término del mismo.

Agradecimiento a todos aquellos asistentes y encargados de Posgrado, Sistemas Escolares, Becas, que me asesoraron y apoyaron en la realización de los trámites correspondientes.

Agradecimiento a mis amigos de mi grupo de maestría Alejandro, Arantxa, Carlo, Claudia, Diana, Erandi, Isabel, Itzel, Israel, José, Lisette, Mario, Mara, Samuel y Zuly, que en conjunto formamos una asombrosa unidad y compartimos muchas cosas que nos permitieron lograr nuestros objetivos y también por todas esas experiencias que pasamos juntos, etc.

Agradecimiento a todos los miembros del Laboratorio de Andrología y Expresión Génica del Departamento de Ciencias de la Salud de la UAM-I. Agradezco

especialmente a Reyna, Irma, Humberto, Leslye, Paola, Iván, Benito, Alan, Lilia, Rigoberto, Guadalupe, Ricardo y Marcos, que me motivaron y apoyaron a pertenecer al Posgrado de Biología Experimental, así como sus invaluable consejos, asesorías, lecciones y sus sinceras palabras fueron necesarias para mejorar.

Agradecimientos a todos los miembros del Laboratorio 51 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV. Agradezco especialmente a Enrique, Ana, Aidée, Mónica, Coral, Danelia, Miguel y Eva, que me permitieron compartir y aprender de cada uno, además de sus palabras llenas de verdad y sugerencias para mejorar en este campo que es la investigación.

Agradecimiento a mi Comité de Tutores que fue de vital importancia para poder determinar lo importante en mi investigación siempre insistir en ver más allá de los datos, qué sucede en la célula, darle la adecuada importancia.

Agradecimiento a los miembros del Jurado, que revisaron este manuscrito y aportaron sus valiosas opiniones y sugerencias para mejorar y esclarecer lo que no se comprendía así las mejoras en la redacción de ciertos párrafos clave. Así como, pero no menos importante, aceptar formar parte del mismo.

Agradecimiento a todos los que revisaron y mejoraron este trabajo que es solo una parte importante de algo más grande, al igual a todos aquellos que se sirvan leer este pequeño manuscrito. Espero que sirva de base para otros trabajos o al menos genere tantas dudas que se pregunten tantas cosas más que necesitamos responder y den paso a más investigación en el área de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Resumen

Los compuestos perfluorados (PFCs) desde los 50s han sido usados ampliamente en productos industriales y de uso común, investigaciones recientes han reportado efectos negativos en los procesos fisiológicos de los organismos expuestos, a estos compuestos ya sea de manera directa o indirecta. El objetivo del presente trabajo fue determinar el posible mecanismo de los perfluorados PFOA y PFOS en la aglutinación espermática en un modelo de espermatozoides de cerdo durante el proceso de capacitación *in vitro*. Se realizaron ensayos *in vitro* con espermatozoides de cerdo capacitados *in vitro* con y sin exposición a PFOA, PFOS, Cu^{2+} ; también se adicionaron los agentes reductores D-PEN y/o DTT para comprobar si PFOA y PFOS median la aglutinación por reducción de grupos sulfhidrilo (-SH). Se encontró que a 1500 μM de PFOA y 1000 μM de PFOS, disminuyó la viabilidad en un 20 % y 30 % con respecto al control, respectivamente; también se observó que afectan el proceso de capacitación ya que a 1000 μM en el caso de PFOA y a 500 μM para PFOS, ambos compuestos disminuyeron en un 15 % el número de espermatozoides capacitados con respecto al grupo control. Aunque ambos compuestos PFOA y PFOS presentan aglutinados, se observaron diferencias entre ellos. PFOA y Cu^{2+} generaron un incremento de los aglutinados pequeños y al ser adicionado D-PEN en conjunto con PFOA se formaron aglutinados tipo rosetas. En el caso de PFOS no se observó ningún cambio respecto al grupo control (sin PFCs) y la interacción de D-PEN con PFOS o D-PEN con Cu^{2+} generó un incremento de los aglutinados grandes. Estos hallazgos indican que ambos compuestos ejercen su acción de manera diferente. La adición de

DTT a cada uno de los grupos tratados con PFCs y Cu^{2+} generó un incremento de los aglutinados de tipo roseta y de los medianos. Los resultados con D-PEN y DTT sugieren que los grupos -SH participan en la aglutinación mediada por PFOA y PFOS.

Abstract

Perfluorinated compounds (PFCs) since the 50s have been widely used in industrial and common use products, recent research has reported negative effects on the physiological processes of exposed organisms, to these compounds either directly or indirectly. The present work aims to determine the possible mechanism of the perfluorinated PFOA and PFOS in sperm agglutination in a boar sperm model during the *in vitro* capacitation process. *In vitro* capacitation tests were carried out in boar sperm with and without exposure to PFOA, PFOS, Cu^{2+} ; the reducing agent D-PEN and / or DTT were also added to verify if the perfluorinated PFOA and / or PFOS mediate agglutination by reduction of sulfhydryl groups (-SH). It was found that at 1500 μM of PFOA and 1000 μM of PFOS, the viability decreased 20 % and 30 % with respect to the control, respectively; it was also observed that they affect the capacitation process at 1000 μM of PFOA and 500 μM of PFOS, both compounds decreased 15 % the capacitation process with respect to the control group. Although both compounds PFOA and PFOS present agglutinates differences. PFOA and Cu^{2+} generated an increase in small-size PFOS values do not change with respect to the control group (without PFCs) and the interaction of D-PEN with PFOS or D-PEN with Cu^{2+} generated an increase in large-size agglutinates. These findings indicate that both compounds act differently. The addition of DTT to each of the groups treated with PFCs and Cu^{2+} generated an increase in rosette-like and medium-size agglutinates. The results with D-PEN and DTT suggest that sulphhydryl groups (-SH) mediated the agglutination by PFOA and PFOS.

Índice General

| | |
|---|------|
| RESUMEN | VI |
| ABSTRACT | VIII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XII |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | XV |
| ÍNDICE DE ECUACIONES | XVI |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 COMPUESTOS PERFLUORADOS..... | 1 |
| 1.2 MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE DE CERDO | 4 |
| 1.3 FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA..... | 5 |
| 1.3.1 <i>Capacitación espermática</i> | 6 |
| 1.3.2 <i>Reacción acrosomal</i> | 8 |
| 1.3.3 <i>Aglutinación espermática</i> | 9 |
| 1.4 AGENTES REDUCTORES USADOS PARA EVITAR LA AGLUTINACIÓN ESPERMÁTICA | 11 |
| 1.4.1 <i>El cobre</i> | 11 |
| 1.4.2 <i>D-penicilamina</i> | 13 |
| 2. ANTECEDENTES | 16 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 17 |
| 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 19 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 19 |
| 6. OBJETIVO GENERAL | 19 |

| | |
|--|----|
| 7. OBJETIVOS PARTICULARES | 19 |
| 8. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 20 |
| 8.1 OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN BÁSICA DE LAS MUESTRAS DE SEMEN DE CERDO | 20 |
| 8.2 VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 20 |
| 8.3 ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 21 |
| 8.4 CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 21 |
| 8.5 MOVILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 22 |
| 8.6 CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 22 |
| 8.7 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL50)..... | 23 |
| 8.8 CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA DE LA CAPACITACIÓN (CIC50)..... | 23 |
| 8.9 AGLUTINACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 23 |
| 8.10 EVALUACIÓN DE LA CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO | 24 |
| 8.11 EVALUACIÓN DE LA AGLUTINACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO | 26 |
| 8.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 27 |
| 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| 9.1 EFECTO DE LOS PERFLUORADOS EN LA VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 31 |
| 9.2 EFECTO DE LOS PERFLUORADOS PFOA Y PFOS EN EL PROCESO DE CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 34 |
| 9.3 EFECTO DE LOS PERFLUORADOS PFOA Y PFOS EN LA AGLUTINACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO Y EL USO DEL D-PENICILAMINA | 37 |
| 9.4 EFECTO DE LOS PERFLUORADOS PFOA Y PFOS EN CONJUNTO CON DTT SOBRE LA AGLUTINACIÓN ESPERMÁTICA. | 49 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 53 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 11. PERSPECTIVAS | 54 |
| 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS PERFLUORADOS. A) PFOA, B) PFOS. TOMADA DE (BIBLOW, 2016)..... | 1 |
| FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS COMPONENTES DEL ESPERMATOZOIDE DE CERDO, ASÍ COMO SUS DIMENSIONES DE UN ESPERMATOZOIDE NORMAL. TOMADA Y MODIFICADA DE (BRIZ & FÀBREGA, 2013)..... | 5 |
| FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA D-PENICILAMINA. TOMADA DE (LEAHY ET AL., 2016A). ... | 13 |
| FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DITIOTREITOL. TOMADA DE (ROCHE, 2021). | 15 |
| FIGURA 5. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LOS PATRONES CON LA TINCIÓN DE CTC DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO. A) SIN CAPACITAR (NC), B) CAPACITADOS (C) Y c) CON REACCIÓN ACROSOMAL (RA). TOMADAS DE (KWON ET AL., 2018)..... | 25 |
| FIGURA 6. MORTALIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO PRODUCIDA POR PFOA. * CORRESPONDE A DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL CONTROL; $P < 0.05$; MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE); $N=8$ | 32 |
| FIGURA 7. MORTALIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO PRODUCIDA POR PFOS. * CORRESPONDE A DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL GRUPO CONTROL; $P < 0.05$; MEDIA \pm DE; $N=8$ | 34 |
| FIGURA 8. PROPORCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO CAPACITADOS EN PRESENCIA DE PFOA Y PFOS. * CORRESPONDE A LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL GRUPO CONTROL; $P < 0.05$; MEDIA \pm DE; $N=3$ | 36 |
| FIGURA 9. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE AGLUTINADOS DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO. A , GRUPO CONTROL, Y GRUPOS CON D-PEN ADICIONADO DESDE EL INICIO O 30 MINUTOS ANTES DE FINALIZAR LAS 4 HORAS DEL PROCESO DE CAPACITACIÓN IN VITRO; B , GRUPO CON Cu^{2+} Y Cu^{2+} D-PEN A 4 HORAS O 30 MINUTOS ANTES DE FINALIZAR EL PROCESO DE | |

CAPACITACIÓN IN VITRO. SE EJEMPLIFICAN CON FLECHAS LOS GRADOS DE AGLUTINACIÓN OBSERVADOS; EL GRADO 0 NO SE SEÑALA PUES SE REFIERE A ESPERMATOZOIDES LIBRES; N=3. IMÁGENES TOMADAS UTILIZANDO MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES A 100 X.39

FIGURA 10. PROPORCIÓN DE GRADOS DE AGLUTINACIÓN (0-4) DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO EN PRESENCIA DE Cu^{2+} Y D-PEN. GRUPO CONTROL; Cu^{2+} ; D-PEN POR 4 HORAS; Cu^{2+} D-PEN POR 4 HORAS; D-PEN 30', ADICIONADO 30 MINUTOS ANTES DE LAS 4 HORAS DE CAPACITACIÓN; Cu^{2+} D-PEN 30', ADICIONADO 30 MINUTOS ANTES DE LAS 4 HORAS DE CAPACITACIÓN. NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS CON RESPECTO AL CONTROL; $P < 0.05$; MEDIA \pm DE; N=3.40

FIGURA 11. PROPORCIÓN DE GRADOS DE AGLUTINACIÓN (0-4) DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO EN PRESENCIA DE PFOA Y D-PEN. GRUPO CONTROL; PFOA; PFOA D-PEN POR 4 HORAS; PFOA D-PEN 30', ADICIONADO 30 MINUTOS ANTES DE LAS 4 HORAS DE CAPACITACIÓN. *DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS RESPECTO AL GRUPO CONTROL; $P < 0.05$; MEDIA \pm DE; N=3. .43

FIGURA 12. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE AGLUTINADOS DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO. **A**, GRUPO CON PFOA Y PFOA D-PEN ADICIONADO DESDE EL INICIO O 30 MINUTOS ANTES DE FINALIZAR LAS 4 HORAS DEL PROCESO DE CAPACITACIÓN IN VITRO; **B**, GRUPO CON PFOS Y PFOS D-PEN A 4 HORAS O 30 MINUTOS ANTES DE FINALIZAR EL PROCESO DE CAPACITACIÓN IN VITRO. SE EJEMPLIFICAN CON FLECHAS LOS GRADOS DE AGLUTINACIÓN OBSERVADOS; EL GRADO 0 NO SE SEÑALA PUES SE REFIERE A ESPERMATOZOIDES LIBRES; N=3. IMÁGENES TOMADAS UTILIZANDO MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES A 100 X.45

FIGURA 13. PROPORCIÓN DE GRADOS DE AGLUTINACIÓN (0-4) DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO EN PRESENCIA DE PFOS Y D-PEN. GRUPO CONTROL; PFOS; PFOS D-PEN POR 4 HORAS; PFOS D-PEN 30', ADICIONADO 30 MINUTOS ANTES DE LAS 4 HORAS DE CAPACITACIÓN. *DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS RESPECTO AL GRUPO CONTROL; $P < 0.05$; MEDIA \pm DE; N=3. .47

FIGURA 14. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE AGLUTINADOS DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO OBSERVADOS CON CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS: **A**, GRUPO CONTROL; **B**, GRUPO CON DTT; **c**, GRUPO CON PFOS; **d**, GRUPO CON PFOS DTT; **e**, GRUPO CON PFOA; **f**, GRUPO CON PFOA DTT; **g**, GRUPO CON Cu^{2+} ; **h**, GRUPO CON Cu^{2+} DTT. SE EJEMPLIFICAN CON FLECHAS LOS GRADOS DE AGLUTINACIÓN OBSERVADOS; N=1. IMÁGENES TOMADAS UTILIZANDO MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES A 100 X.50

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LA AGLUTINACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 26 |
| TABLA 2 DECLARACIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES..... | 27 |
| TABLA 3. PROPORCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO POR GRADO DE AGLUTINACIÓN (0–4) EN EL GRUPO CONTROL Y EN PRESENCIA DE Cu^{2+} Y D-PEN POR 30´Y 4H; MEDIA \pm DE; N=3..... | 40 |
| TABLA 4. PROPORCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO POR GRADO DE AGLUTINACIÓN (0–4) EN PRESENCIA DE PFOA Y D-PEN POR 30´Y 4H; MEDIA \pm DE; N=3. | 43 |
| TABLA 5. PROPORCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO POR GRADO DE AGLUTINACIÓN (0–4) EN PRESENCIA DE PFOS Y D-PEN POR 30´Y 4H; MEDIA \pm DE; N=3. | 48 |

Índice de ecuaciones

| | |
|--|----|
| ECUACIÓN 1. REACCIONES DE OXIDACIÓN Y REDUCCIÓN DEL COBRE. TOMADAS DE (CAÑIZARES MACÍAS & DUARTE LISCI, 2009). | 12 |
| ECUACIÓN 2. REACCIÓN DE FENTON. TOMADAS DE (AITKEN, 2017)..... | 12 |
| ECUACIÓN 3. REACCIÓN DE HABER-WEISS. TOMADA DE (AITKEN, 2017). | 12 |
| ECUACIÓN 4. REACCIÓN DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO. TOMADA DE (CAREY, 2006). | 14 |
| ECUACIÓN 5. CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO..... | 22 |
| ECUACIÓN 6. REGRESIÓN DE PROBIT. TOMADA DE (NCSS, 2021)..... | 28 |
| ECUACIÓN 7. ANOVA. TOMADA Y MODIFICADA DE (DEVORE, 2016). | 29 |
| ECUACIÓN 8. TUKEY O HSD. TOMADA Y MODIFICADA DE (DEVORE, 2016). | 30 |

1. Introducción

1.1 Compuestos perfluorados

Los compuestos perfluorados (PFCs) están constituidos por cadenas alifáticas modificadas, en las que se sustituyen los átomos de hidrógeno por otros de flúor, formando enlaces covalentes carbono-flúor (figura 1), que les confiere estabilidad química, térmica y actividad superficial. Los PFCs son de carácter anfifílico, ya que la cadena es hidrófoba junto con un grupo terminal hidrofílico. Los PFCs poseen propiedades únicas como resistencia a la degradación física, química, metabólica y al fuego, son repelentes a aceites, grasas y al agua (Beggs et al., 2016). Los PFCs pueden sintetizarse a partir de compuestos perfluoro o polialquilados.

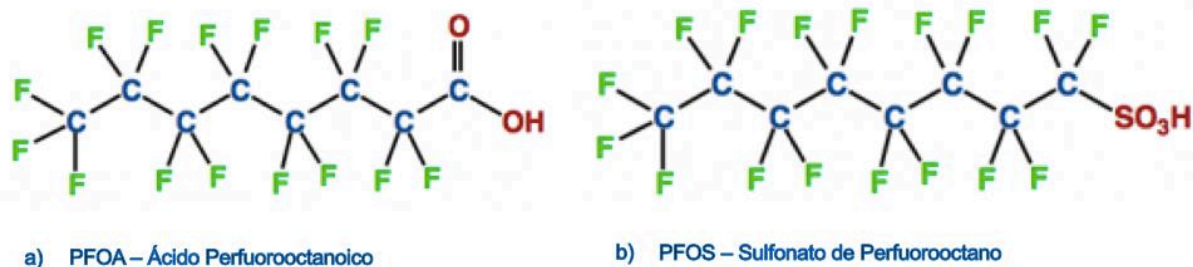


Figura 1. Estructura química de los compuestos perfluorados. a) PFOA, b) PFOS. Tomada de (Biblow, 2016).

Existen dos grupos de perfluoroalquilados, los que contienen en su estructura un grupo carboxilo (-COOH), como el ácido perfluorooctanoico (PFOA), y los que tienen un grupo sulfonato (-SO₃⁻), como el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) (figura 1). Ambos

PFCs poseen una cadena de ocho átomos de carbono, variando únicamente en el grupo funcional terminal.

Los PFCs se han producido y utilizado desde los años 50s del siglo pasado, debido a sus propiedades surfactantes y su alta resistencia a la degradación, se han usado ampliamente en la industria y en productos de uso cotidiano, como es el caso de recubrimientos de aceros, textiles, empaques de comida, productos de limpieza, curtido de pieles, en las industrias petrolera y electrónica, etc. (Beggs et al., 2016; Kang et al., 2016; Xu et al., 2019). La producción, distribución y uso excesivo, tanto de PFOS como de PFOA, han generado una gran acumulación, considerándose contaminantes ambientales a nivel mundial.

Los productos de consumo y uso cotidiano, como los alimentos y el agua son los medios principales de exposición a estos compuestos perfluorados. Para PFOS la ingesta diaria tolerable (TDI) es de 150 ng por Kg de peso corporal, mientras que la de PFOA es de 1500 ng por Kg de peso corporal, según el último informe sobre PFCs de la European Food Safety Authority (EFSA), en 2008 (Leter et al., 2014). El exceder estos valores de referencia a través de la dieta es improbable, pero es posible encontrarlo en personas ocupacionalmente expuestas en plantas de producción de PFCs, reportándose una concentración de 5000 ng/mL para PFOA y de 1000-2000 ng/mL para PFOS en plasma (Yang et al., 2017). La vida media de PFOS y de PFOA es de 2 a 5 años en organismos, debido a su bioacumulación (Beggs et al., 2016; Kang et al., 2016; Xu et al., 2019).

En décadas recientes se han implementado políticas de regulación, por ejemplo, el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs)

celebrado en el 2015. El comité decidió que se deberían desarrollar criterios de selección para PFOA y compuestos relacionados. PFOS ya estaba incluido en dicho convenio en el 2009 (Kang et al., 2016). La amplia distribución de estos compuestos en fuentes de agua ha contribuido al establecimiento de límites para que el agua sea considerada apta para el consumo humano por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), por el Instituto Federal Alemán de Evaluación de Riesgos (BfR) en Alemania y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Roos et al., 2008). En países industrializados se han implementado formas de reducir su uso, por lo menos los de cadena larga, como son el PFOA y PFOS, sustituyéndolos por compuestos de cadena más corta como el ácido pefluorohexanoico (PFHxS); no obstante, en países en creciente industrialización y países en vías de desarrollo, aún siguen siendo utilizados (Raymer et al., 2012; Roos et al., 2008).

La primera evidencia de que los PFCs suponen un riesgo para la salud se obtuvo de estudios realizados con animales de experimentación, aunque para que se establezcan conclusiones válidas es necesario realizar experimentos a largo plazo, ya que cuando se trata de sustancias lipofílicas, se acumulan en tejido graso y pueden causar efectos tóxicos tardíos (Steves et al., 2018). Los efectos nocivos de estos tóxicos se observaron en hígado, sistema inmune, sistema reproductor, entre otros (Xu et al., 2019; Yang et al., 2017; Zeng et al., 2019). También pueden producir efectos tóxicos sobre el pulmón y pueden actuar como disruptores endocrinos, alterando los niveles hormonales (Lei et al., 2015; Xu et al., 2019), pueden ocasionar aumento de la concentración de colesterol y aumentar el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer

(Kang et al., 2016; Xu et al., 2019). Se debe tener especial precaución en mujeres embarazadas ya que la exposición a PFCs puede conllevar al desarrollo de preeclampsia teniendo efectos tanto en la madre como en el producto (Wikström et al., 2019). Por otra parte Johnson y colaboradores (2014) mencionan que hay una repercusión en el peso fetal en humanos durante la etapa prenatal ocasionada por la exposición a PFOA así como en roedores. Se ha observado que las vías principales de exposición a los PFCs son la ingesta de comida y agua, la inhalación, y la leche materna (Louis et al., 2015).

1.2 Morfología del espermatozoide de cerdo

Las células espermáticas son las células haploides masculinas, cuya función es almacenar y transmitir la información genética de padre durante el proceso de fertilización hacia el ovocito, desencadenando en la formación de un nuevo organismo. La célula espermática está delimitada por una membrana plasmática y está formada por una cabeza y un flagelo o cola, unidas por la pieza de conexión (figura 2). La mayor parte de la región de la cabeza corresponde a núcleo y el acrosoma; el flagelo se subdivide en tres regiones: la pieza media que contiene la hélice mitocondrial, la pieza principal y la pieza terminal; el acrosoma es un pequeño saco que contiene enzimas que ayudan al espermatozoide a atravesar las capas que rodean al óvulo y poder lograr la fertilización; las mitocondrias generan la energía necesaria para la movilidad de la célula espermática (Briz & Fàbrega, 2013).

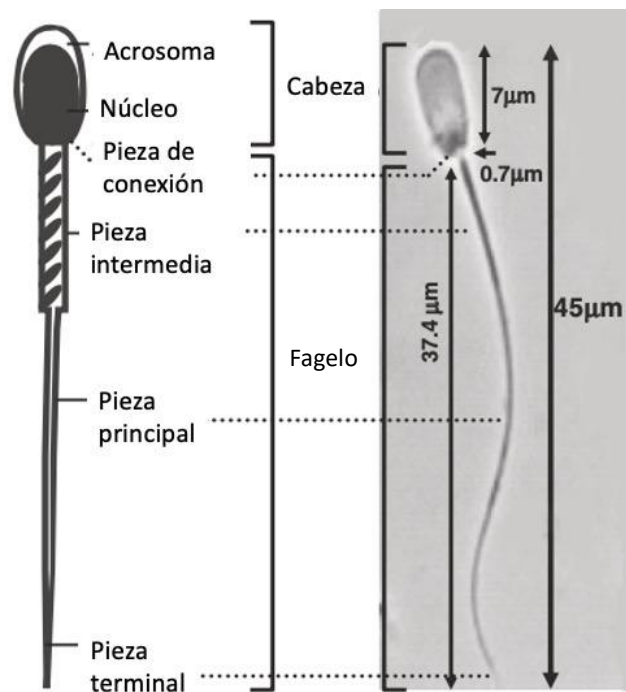


Figura 2. Representación esquemática de los componentes del espermatozoide de cerdo, así como sus dimensiones de un espermatozoide normal. Tomada y modificada de (Briz & Fàbrega, 2013).

1.3 Fisiología espermática

Los espermatozoides sufren una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos durante el recorrido epididimal, los cuales son atribuidos a la subsecuente interacción con secreciones específicas del epitelio epididimal (Burgos et al., 1992). El tiempo requerido para que los espermatozoides de cerdo atraviesen el epidídimo es de tres días en la cabeza, dos en el cuerpo y de cuatro a nueve en la cola. Durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo, ocurre el proceso de maduración que toma lugar principalmente en las primeras dos regiones del epidídimo; una vez

terminado este proceso, los espermatozoides se van almacenado en la cola del epidídimo hasta que son eyaculados (Hess & de Franca, 2008). La duración de la travesía de los espermatozoides a través del epidídimo varía entre especies y se puede reducir de un 10-20 % cuando aumenta la frecuencia con que este eyacula (Setchell, 1991). Como resultado de esto, se pueden encontrar células con diferentes estados de madurez en un eyaculado, lo que contribuye a aumentar o disminuir el potencial de fertilidad (Briz et al., 1995).

Durante su paso a través del epidídimo, los espermatozoides se enfrentan a variaciones en el ambiente iónico; en la cabeza del epidídimo la concentración de iones sodio es superior a 100 nM y disminuye hasta <50 mM en la cola. Dichas variaciones ejercen un efecto de maduración sobre la célula espermática, lo que se ve reflejado en procesos morfo-fisiológicos como: modificaciones en los patrones de movimiento, de la forma del acrosoma y de la membrana plasmática, cambios en los patrones metabólicos, en la estructura de los organelos de la cola y en la cromatina nuclear, pérdida de la gota citoplasmática y disminución progresiva del agua con aumento de la gravedad específica (Briz et al., 1995).

1.3.1 Capacitación espermática

La capacitación espermática es un proceso que requiere el espermatozoide para poder adquirir la habilidad fertilizante, en el cual ocurren distintos cambios bioquímicos. El proceso de capacitación es llevado a cabo por un incremento en la concentración intracelular de bicarbonato que está mediada por canales iónicos de cloro/bicarbonato ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) y sodio/bicarbonato ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$) así como por efecto de la anhidrasa

carbónica que puede estar involucrada en el mantenimiento de altas concentraciones de bicarbonato por la conversión del CO₂ difundido (Flesch & Gadella, 2000). Este incremento permite la activación de la adenilato ciclasa soluble (ACs) que incrementa las concentraciones de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), generando la activación de proteína cinasa A (PKA) que media la activación de proteínas tirosina cinasas (PTKs) incrementando la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y una inhibición de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) (Bernecic, Gadella, et al., 2019). Esto permite la reorganización de la membrana mediante la activación de escramblasas permitiendo la remoción de colesterol lo cual incrementa la fluidez de la membrana y rearreglo de fosfolípidos, así como la activación de canales de Ca²⁺ favoreciendo un incremento de Ca²⁺ mediante canales dependientes de voltaje, canales CatSper, e intercambiadores de sodio-calcio (Na⁺/Ca²⁺) y Ca²⁺-ATPasa (Visconti et al., 2011).

La entrada de calcio (Ca²⁺) genera la hiperactivación, que es un evento que estimula la movilidad propulsora requerida para los eventos que conducen a la unión a la zona pelúcida (ZP); los factores descapacitantes son eliminados de la superficie del espermatozoide, descubriendo receptores como el de progesterona (Bernecic, Gadella, et al., 2019).

La redistribución de fosfolípidos, colesterol, glicolípidos y glicoproteínas favorece la formación de microdominios de membrana resistentes a detergentes (DRM's por sus siglas en inglés) que llevan a cabo funciones como la de señalización intracelular en respuesta a moléculas del tracto reproductor femenino que van a permitir la liberación,

migración, reconocimiento e interacción de las células espermáticas capacitadas con las proteínas asociadas a la ZP (van Gestel et al., 2005).

1.3.2 Reacción acrosomal

La reacción acrosomal (RA) consta de una serie de cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que provocan la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del espermatozoide permitiendo la liberación del contenido acrosomal, como las proteasas, que degradan la ZP. Este proceso genera la interacción entre las glicoproteínas del espermatozoide con los receptores de la ZP ocasionando un incremento en la fosforilación. El aumento en la concentración de progesterona en el oviducto y en la ZP, así como altas concentraciones extracelulares de Ca^{2+} , permiten la activación de los receptores de progesterona así como un incremento del pH intracelular (Flesch & Gadella, 2000). Éste desencadena la despolarización de la membrana, así como la activación de las proteínas G y la activación de los canales de calcio tipo T dependientes de voltaje, permitiendo el incremento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y la activación de la fosfolipasa C (PLC). La activación de PTK con el Ca^{2+} generan la fusión de membranas liberando así las enzimas del acrosoma, permitiendo el paso del espermatozoide hacia el ovocito. Una vez que el espermatozoide interacciona con el ovocito, se realiza la liberación de los gránulos corticales evitando así la polispermia; la interacción y fusión de los gametos da como resultado final la fertilización y el desarrollo embrionario (Flesch & Gadella, 2000).

1.3.3 Aglutinación espermática

La aglutinación espermática es la unión de 2 o más espermatozoides, pueden ser uniones cabeza-cabeza, cabeza-cola y/o cola-cola. De acuerdo con Monclus y Fornes (2016) las asociaciones espermáticas de cabeza-cabeza o cola-cola que se presentan en algunas especies de mamíferos en las regiones del epidídimo, así como en el tracto reproductor femenino, no deben ser consideradas como aglutinados sino como conjugación espermática que pueden ser denominadas como asociaciones, rouleaux, rosetas, etc. Los aglutinados denominados rouleaux se presentan en algunas especies de cobayo, armadillo y loris, reportándose que favorecen la inhibición de las RA anticipada y como un protector de la viabilidad espermática, la cual se presume que es regulada por la proteína WH-30; las rosetas se presentan en ratón, rata y chinchilla; en humanos, en estudios *ex vivo* (en el tracto reproductor de la mujer) se reportó la formación de agregados que son considerados aglutinados, sin embargo, se han asociado a infertilidad inmunológica; en el caso de cerdo, toro, carnero, etc., se puede llamar aglutinado a la asociación de dos o más células espermáticas al ser incubadas en un medio definido (Monclus & Fornes, 2016). En espermatozoides de cerdo se observó la formación de aglutinados al ser incubados en un medio de capacitación con análogos de AMPc y bicarbonato, los cuales no presentan efectos negativos en el proceso de fertilización (Bollwein et al., 2004; Harayama et al., 2003).

Existen diversas causas que pueden generar las aglutinaciones, tanto en condiciones normales como patológicas. En condiciones normales, la aglutinación espermática se presenta durante el proceso de maduración en el epidídimo, en la que los espermatozoides sufren modificaciones en su estructura y adquieren factores

descapacitantes que inhiben el proceso de capacitación dentro del sistema reproductivo masculino (Bhoumik et al., 2018).

También se pueden formar aglutinados cuando los espermatozoides se unen mediante sus cabezas a los cilios del epitelio de la región ampular y de la región del itsmo (Ardon et al., 2016), lo cual parece ser necesario para detener el proceso de capacitación espermática hasta la ovulación, permitiendo que el espermatozoide fertilice al óvulo (Betarelli et al., 2018; Ded et al., 2010).

La presencia de aglutinación espermática puede ser debida a malformaciones en el espermatozoide, por contaminación bacteriana (Briz et al., 1996; Yeste et al., 2008).

En condiciones patológicas, la aglutinación se puede deber a alteraciones morfológicas durante el proceso de espermatogénesis, a la interacción de los espermatozoides con células inmunológicas del mismo organismo, debido a alteraciones en los tejidos cómo la barrera hematotesticular, así como a las infecciones en el tracto reproductivo (Monclus & Fornes, 2016). La exposición a PFOA y PFOS se ha asociado con una disminución en la producción de espermatozoides en humanos (Joensen et al., 2009; Kang et al., 2019). En la capacitación de espermatozoides *in vitro* se ha observado que su aglutinación es favorecida por la presencia del HCO_3^- , por iones divalentes metálicos como el Fe^{2+} y Cu^{2+} , que median la reducción de grupos sulfhidrilo (-SH) o tiol de algunas proteínas con residuos de cisteína (Leahy et al., 2016a). El Cu^{2+} puede provocar alteraciones en el espermatozoide generando no solo aglutinación espermática sino que además puede generar un decremento de la movilidad progresiva el cual es irreversible, incluso con la adición de un agente

quelante, siendo éste, el principio de funcionamiento del dispositivo intrauterino (DIU) (Holland & White, 1982).

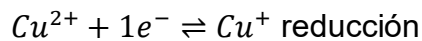
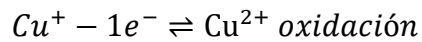
1.4 Agentes reductores usados para evitar la aglutinación espermática

Las reacciones de oxido-reducción se llevan a cabo mediante la participación de un agente oxidante, un agente reductor y la participación del electrón (e^-) como partícula de intercambio. En estas reacciones una especie se oxida cediendo un electrón y la otra especie se reduce ganando el electrón (Cañizares Macías & Duarte Lisci, 2009).

1.4.1 El cobre

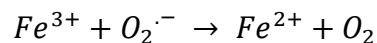
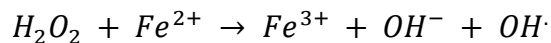
El cobre, al tener dos estados de oxidación, cuproso (Cu^+) y cúprico (Cu^{2+}), puede actuar como un agente oxidante o como agente reductor (Ecuación 1) (Tvrda et al., 2015). Se puede llevar a cabo la oxidación de grupos -SH libres de proteínas con residuos de cisteína al reducirse, actuando como un agente oxidante; esto propicia la formación de los complejos cobre-sulfhidrilo de la proteína (Cu^{2+} -RSH) y posteriormente la interacción de dos radicales tiolato (S-) que llevan a la formación de enlaces disulfuro (-SS-) generando así un incremento en la aglutinación espermática (Leahy et al., 2016a).

Ecuación 1. Reacciones de oxidación y reducción del cobre. Tomadas de (Cañizares Macías & Duarte Lisci, 2009).

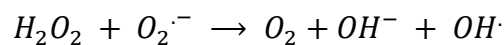


Por otra parte, el Cu^{2+} puede favorecer la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) por la reacción de Fenton (Ecuación 2) o Habers-Weiss (Ecuación 3), específicamente la formación de radicales hidroxilo ($OH\cdot$) y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a partir del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pudiendo estar implicada en la generación de lesiones de lipoperoxidación en la membrana plasmática del espermatozoide (Aitken, 2017).

Ecuación 2. Reacción de Fenton. Tomadas de (Aitken, 2017).



Ecuación 3. Reacción de Haber-Weiss. Tomada de (Aitken, 2017).



1.4.2 D-penicilamina

La penicilamina (D-PEN) es un producto de degradación de la penicilina que contiene un grupo amina, que es utilizado para tratar la enfermedad de Wilson (figura 3) (Abrahams et al., 1943; Sciegienka et al., 2017). D-PEN está conformada también por un grupo funcional carboxilo y un sulfhidrilo, por más de 50 años se ha utilizado para tratar las toxicidades provocadas por el cobre pero no posee propiedades antibacterianas (Walshe, 1956). El grupo sulfhidrilo tiene importancia biológica, ya que puede combinarse con una multitud de compuestos y actuar como quelante de moléculas como el Cu^{2+} , arsénico, mercurio y plomo, así como antioxidante en medios de preservación espermática disminuyendo las EROS, mediante reacciones de oxidoreducción (Eidelman & Lowry, 2016; Netter et al., 1987; Uribe et al., 2020).

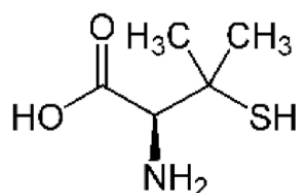


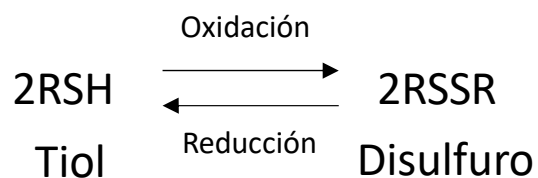
Figura 3. Estructura química de la D-penicilamina. Tomada de (Leahy et al., 2016a).

Como se mencionó anteriormente, la D-PEN es un agente reductor que actúa generando un proceso de oxidación, lo cual ocasiona una ruptura de los enlaces disulfuro generando una disminución de la aglutinación; D-PEN también puede actuar

como agente quelante del cobre impidiendo así el proceso de oxidación de grupos - SH libres (Leahy et al., 2016a).

La D-PEN actúa formando complejos con los grupos sulfhidrilo, mediante la oxidación de los grupos sulfhidrilo libres principalmente de residuos de cisteína generando un enlace disulfuro, el cual es favorecido por el tiolato (S-) que se une a los átomos de azufre de un enlace disulfuro; éste se rompe y forma un nuevo enlace disulfuro y el otro átomo es liberado como tiolato teniendo una carga negativa. Este tiolato es atacado nuevamente hasta favorecer la formación de un enlace disulfuro entre dos cisteínas de una proteína, este proceso se lleva a cabo mediante la participación de un agente oxidante el cual favorece la reacción, en este caso puede ser debido a la presencia de EROS o de un ion divalente como es el Cu^{2+} (Ecuación 4) (Leahy et al., 2016a).

Ecuación 4. Reacción de los grupos sulfhidrilo. Tomada de (Carey, 2006).



En espermatozoides de carnero se ha utilizado D-penicilamina (D-PEN) un agente reductor, antioxidante y quelante que actúa previniendo o inhibiendo la aglutinación generada por Cu^{2+} . Adicionalmente el compuesto Ditiotreitól (DTT) (figura 4) también puede actuar como un agente reductor de enlaces disulfuro, ejerciendo un efecto similar a D-PEN en cuanto a reducción de -SH (Leahy et al., 2016a, 2016b).

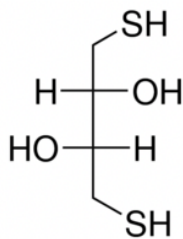


Figura 4. Estructura química del ditiotreitól. Tomada de (Roche, 2021).

Las proteínas ricas en grupos -SH se encuentran localizadas en la membrana plasmática del espermatozoide asociadas a las proteínas involucradas en la iniciación de cascadas de señalización durante la capacitación (de Lamirande & Gagnon, 2003). Éstas se ven afectadas por la generación de EROS como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La alteración en la formación de EROS afecta el proceso de capacitación espermática a baja concentraciones favorece este proceso debido a un incremento en la fosforilación de tirosinas mientras que a altas concentraciones puede llevar a la generación de estrés oxidativo desencadenando en

un incremento en la mortalidad por daño en la membrana (Awda et al., 2009; Boerke et al., 2013; O'Flaherty & Matsushita-Fournier, 2017).

El balance en la producción de EROS es importante ya que podría inducir alteraciones durante el proceso de capacitación. Este balance puede estar mediado por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que dismuta el $O_2^{\cdot-}$ en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Si bien el $O_2^{\cdot-}$ no está considerado como un inductor de lipoperoxidación, puede estar involucrado con la formación de radicales tioles ($-S^{\cdot}$). Al reaccionar con los $-SH$ creando puentes disulfuro ($-SS-$) o un producto de tiolación con otras sustancias como el glutatión (de Lamirande & Gagnon, 1998). Además, el $O_2^{\cdot-}$, en ciertas concentraciones se ha asociado con la adquisición de movilidad progresiva en los espermatozoides. Sin embargo, un desbalance en la oxidación de los grupos tiol, modifica la movilidad en espermatozoides maduros de rata y humano (Cabrillana et al., 2016), lo cual es un efecto negativo pues es bien sabido que la buena movilidad le permite al espermatozoide llegar al óvulo y fertilizarlo (Bhoumik et al., 2018).

2. Antecedentes

En el laboratorio de Andrología de la U.A.M-I se determinó que la concentración letal media (CL_{50}) de PFOS es de 460.55 μM en espermatozoides de cerdo durante el proceso de capacitación *in vitro* (Ortiz-Sánchez, 2017; Oseguera-López, 2020). Además, se observó un aumento en el número de espermatozoides aglutinados y en el tamaño de los aglutinados a partir de 92 μM , comparado con el grupo control, donde se observaron solo aglutinados pequeños, lo cual es un fenómeno normal en la

capacitación, siendo a concentraciones mayores a 460.55 μM que se observan aglutinados grandes. Conforme aumentó la concentración de PFOS (a partir de una concentración de 230 μM), se encontró también una disminución de espermatozoides capacitados, reaccionados, y un efecto en su movilidad; pasaron de movilidad progresiva rápida a movilidad progresiva lenta, no progresivo, y a 3000 μM se observó inmovilidad total. Además se encontró que a concentraciones inferiores a 460 μM disminuye la producción de EROS (Ortiz-Sánchez, 2017).

El compuesto PFOA generó una disminución en el tamaño de los aglutinados, pasando de espermatozoides medianos y grandes, a aglutinados pequeños y medianos a una concentración de 950 μM así como una disminución en el porcentaje de aglutinados medianos y grandes (60 %) respecto al control (83 %) (Hernández-Ojeda, 2017).

Dado que estos dos compuestos tuvieron un efecto contrario en la aglutinación de los espermatozoides, se pretende utilizarlos para conocer el mecanismo de aglutinación de espermatozoides de cerdo debido a que a la fecha hay poca información al respecto.

3. Justificación

En el ser humano se han detectado niveles altos de PFOS en plasma y suero, lo cual se ha correlacionado con la reducción en la producción de espermatozoides normales y una disminución en los embarazos (Joensen et al., 2009; Raymer et al., 2012). En espermatozoide de cerdo se ha observado que la exposición a PFOS y PFOA provocan la formación de aglutinados (Hernández-Ojeda, 2017; Ortiz-Sánchez, 2017).

La aglutinación espermática es un proceso normal, pero que puede repercutir negativamente en la salud reproductiva, dependiendo de su lugar de formación, si se prolonga, o si se incrementa masivamente y si se genera un efecto desaglutinante en condiciones específicas (Bollwein et al., 2004). Además, existen pocos estudios de cómo PFOS y PFOA afectan de manera directa o indirecta al sistema reproductivo, pues se ha encontrado que pueden generar alteración en las EROS (Kang et al., 2019; Raymer et al., 2012; Xu et al., 2019).

Se ha observado en nuestro laboratorio que PFOS y PFOA producen efectos contrarios en la aglutinación de los espermatozoides de cerdo, aunque ambos tienen el mismo número de carbonos, pero difieren en su grupo funcional carboxilo o sulfonato.

Consideramos que el uso de compuestos reductores como D-PEN o Ditiotreitól (DTT), generarán un equilibrio en los estados de óxido-reducción de los grupos -SH provocando una disminución en la aglutinación generada por PFOS y un incremento en la inhibición generada por PFOA.

Una respuesta similar a los perfluorados se espera al utilizar Cu^{2+} generando un incremento en la formación de aglutinados al igual que PFOS; mientras que al adicionar D-PEN se revertirá este incremento en la aglutinación espermática, comportándose como PFOA.

4. Pregunta de Investigación

¿Cómo PFOA y PFOS afectan la aglutinación espermática?

5. Hipótesis

La aglutinación mediada por los perfluorados PFOA y PFOS es debida a una oxidación de los -SH libres, por tanto, al adicionar un agente reductor como D-PEN se espera una inhibición de los aglutinados.

6. Objetivo General

Investigar el mecanismo por el cual PFOA y PFOS modifican la aglutinación.

7. Objetivos Particulares

1. Evaluar el grado de aglutinación mediada por PFOS y PFOA *in vitro*.
2. Evaluar si el estado de los -SH está relacionado con la aglutinación mediada por PFOS y PFOA.
3. Evaluar si D-PEN, DTT y Cu^{2+} modifican la aglutinación mediada por PFOS y PFOA.

8. Material y Métodos

8.1 Obtención y evaluación básica de las muestras de semen de cerdo

Se utilizaron 8 muestras de semen de 4 cerdos de raza Duroc de entre 2 y 3 años, de la granja “Mejoramiento Genético Pigar”, las cuales se recolectaron mediante el método de mano enguantada y 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.

Las muestras se trataron de manera individual. Cada experimento se realizó por duplicado. El número de muestras utilizado para cada experimento está indicado en cada gráfica y tabla.

Una vez en el laboratorio, se evaluaron los parámetros de viabilidad, concentración, movilidad y alteraciones morfológicas de las muestras de espermatozoides de acuerdo con parámetros establecidos (González-Urdiales et al., 2006). 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: movilidad y viabilidad $\geq 85\%$, concentración $> 50 \times 10^6$ espermatozoides/mL y $< 15\%$ de espermatozoides anormales (Betancourt et al., 2006).

8.2 Viabilidad de espermatozoides de cerdo

La viabilidad se cuantificó utilizando la tinción diferencial de eosina-nigrosina. Se realizaron frotis colocando en un portaobjetos 5 μ L de muestra espermática más 5 μ L del colorante eosina-nigrosina. Posteriormente se analizaron mediante microscopía

óptica a 400 X y se contaron 100 espermatozoides. Se calculó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos; considerando vivos aquellas células sin coloración, y muertos aquellas células que presentan una coloración rosada (Betancourt et al., 2006).

8.3 Alteraciones morfológicas de espermatozoides de cerdo

Con los mismos frotis de eosina-nigrosina, se evaluaron las alteraciones en la morfología espermática en cabeza, pieza media y flagelo. Se analizaron 100 espermatozoides y se determinó el porcentaje de anormalidades.

8.4 Concentración de espermatozoides de cerdo

Se determinó mediante el uso de un microscopio óptico de contraste de fases y una cámara de Neubauer; la muestra de espermatozoides fue diluida en agua destilada a una proporción de 1:100 y se colocaron 10 μ L de muestra en cada una de las cuadrículas de recuento de la cámara. Se contabilizaron los 4 cuadrantes de las esquinas, los cuales tienen 1 mm² de superficie, que a su vez están divididos en 16 cuadros más pequeños, y la profundidad de la cámara es de 0.1 mm. Una vez contabilizadas las células espermáticas de cada cuadrante se utilizó la siguiente fórmula (Ecuación 5) para determinar la concentración de espermatozoides:

Ecuación 5. Concentración de espermatozoides de cerdo.

$$\frac{\text{Número de espermatozoides}}{\mu\text{L de muestra}} = \frac{\text{Promedio de espermatozoides en los 4 cuadrantes}}{\text{superficie contabilizada (mm}^2\text{) } \times \text{profundidad de cámara (mm) } \times \text{factor de dilución}}$$

8.5 Movilidad de espermatozoides de cerdo

Se evaluó la movilidad masal de la muestra mediante microscopía óptica, la cual es una valoración subjetiva de la formación de remolinos, la velocidad del desplazamiento, la densidad de los remolinos clasificándose de 0-5; también se evaluó la movilidad individual para determinar porcentaje de movimiento progresivo lento y rápido clasificándolos de 0-5 (Cabrillana et al., 2016; González-Urdiales et al., 2006). Después de realizar la valoración de la muestra espermática y confirmar que tenía las características adecuadas, se procedió a la capacitación espermática *in vitro*.

8.6 Capacitación de espermatozoides de cerdo

Se incubaron 5×10^6 espermatozoides/mL en medio de capacitación (TALP-HEPES suplementado con 6 mg/mL de BSA fracción V y 1 mM de piruvato de sodio) ajustado el pH a 7.3, a 38 °C por 4 h (Jiménez et al., 2003).

8.7 Concentración letal media (CL₅₀)

Con el fin de determinar los valores de la CL₅₀, se incubaron espermatozoides sin PFCs (grupo control) y también en presencia de éstos, a las concentraciones de: 1000, 2000 y 3000 µM de PFOS y 500, 1000, 1500, 2000, 2500 µM de PFOA.

8.8 Concentración inhibitoria media de la capacitación (CIC₅₀)

Con el fin de determinar los valores de la concentración inhibitoria media de la capacitación (CIC₅₀), se incubaron espermatozoides sin PFCs (grupo control) y en presencia de éstos, a las concentraciones de: 500, 1000, 2000 y 3000 µM para ambos PFCs.

8.9 Aglutinación de espermatozoides de cerdo

Los espermatozoides de cerdo se incubaron en un medio de capacitación (control) y medio de capacitación con PFOA con ½ de la CL₅₀, PFOS con CIC₅₀, y Cu²⁺ 10 mM. Para determinar si la aglutinación espermática está mediada por la oxidación de los grupos -SH libres o por un efecto antioxidante, se incubaron los grupos anteriores, pero adicionando D-PEN 1 mM en dos momentos: 1. La adición de D-PEN al inicio de la incubación sólo o junto con los tratamientos de PFCs y también con el Cu²⁺, a estos grupos se les denominó con el nombre del tratamiento más las siglas D-PEN. 2. La adición D-PEN se realizó después de estar en incubación por tres horas y media con los tratamientos, denominándolos D-PEN treinta minutos (D-PEN 30') que es el

tiempo restante para culminar las 4 horas de incubación (capacitación) o con el nombre del PFCs o del Cu^{2+} más D-PEN 30'. También se utilizó otro agente que permite la reducción de enlaces disulfuro que es el Ditioneitol (DTT) 0.1 mM, y se incubó con los grupos mencionados anteriormente, adicionándolo al inicio de la capacitación, y se le denominó con el nombre del perfluorado o del Cu^{2+} más DTT.

8.10 Evaluación de la capacitación de espermatozoides de cerdo

Para evaluar la capacitación espermática se utilizó la tinción con CTC, siguiendo la metodología descrita por Mattioli y colaboradores (1996) con algunas modificaciones. La CTC es un antibiótico que puede atravesar la membrana plasmática uniéndose al calcio intracelular libre y favoreciendo así la generación de complejos clortetraciclina- Ca^{2+} , uniéndose preferentemente a las regiones hidrofóbicas de la membrana plasmática y de las membranas acrosomales, y su redistribución determina el estado funcional de espermatozoide (Conejo-Nava et al., 2003; Kwon et al., 2015; Kwon et al., 2018).

Una vez terminado el proceso de capacitación *in vitro* se colectaron las muestras espermáticas en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se realizaron dos lavados de las muestras a 600 g por 5 minutos con PBS. Al finalizar los lavados se resuspendió el botón en PBS; el día de la evaluación se preparaba la solución de CTC (Tris 20 mM, NaCl 130 mM, L-Cisteína 5 mM y clortetraciclina 750 μM a pH 7.8) la cual se protegía de la luz con papel aluminio. En un portaobjetos se colocaron 5 μL de espermatozoides más 5 μL de solución de CTC y se mezclaron suavemente con la punta de la pipeta. A

los 30 segundos se adicionaron 5 μ L de solución fijadora (glutaraldehído al 0.2 % en Tris 0.5 mM a pH 7.4) y se cubrió con un cubreobjetos. Posteriormente se observaron las muestras mediante microscopía de epifluorescencia a (459 nm) utilizando un filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC por sus siglas en inglés). Se contabilizaron 100 células y se clasificaron de acuerdo con los patrones descritos por Kwon y colaboradores (2018) en: a) espermatozoides no capacitados (NC) aquéllos que presentan fluorescencia intensa en toda la cabeza y pieza media del flagelo, b) espermatozoides capacitados (C) aquéllos que presentan fluorescencia intensa de la parte apical a ecuatorial en la cabeza y en la pieza media del flagelo y c) espermatozoides con RA aquéllos que presentan fluorescencia intensa en la parte ecuatorial de la cabeza y pieza media del flagelo, o solo fluorescencia en la pieza media del flagelo (figura 5).

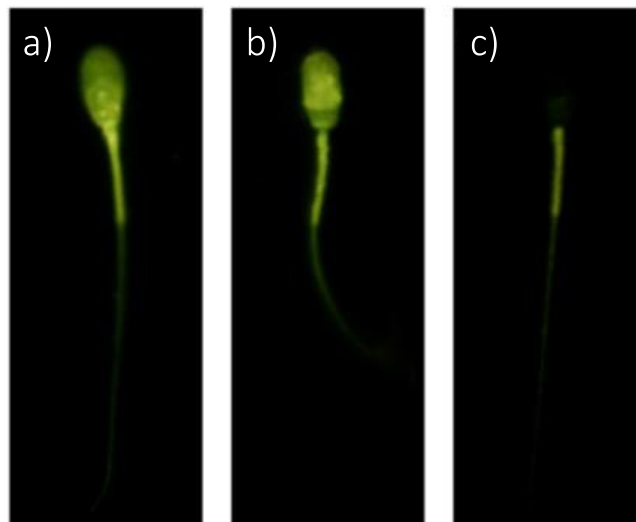


Figura 5. Imágenes representativas de los patrones con la tinción de CTC de espermatozoides de cerdo. **a)** sin capacitar (NC), **b)** capacitados (C) y **c)** con reacción acrosomal (RA). Tomadas de (Kwon et al., 2018).

8.11 Evaluación de la aglutinación de espermatozoides de cerdo

Se evaluó la aglutinación mediante microscopía de contraste de fases. Se colocaron 10 μL de muestra en un portaobjetos y se observaron a 100 X, contabilizándose 10 campos diferentes. Se realizó una clasificación de los aglutinados del grado 0 al 4, con base en los valores descritos en humano por la OMS, referenciados por Berger y colaboradores (2019), con modificaciones; donde 0) corresponde a espermatozoides libres 1) espermatozoides aglutinados tipo rosetas, 2) aglutinados pequeños, 3) aglutinados medianos, y 4) aglutinados grandes o muy grandes (aglomerados), tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la aglutinación de espermatozoides de cerdo.

Tomada y modificada de (Berger et al., 2019).

| Grado de aglutinación | Número de espermatozoides |
|-----------------------|---------------------------|
| 0 | Sin adhesión (libres) |
| 1 | < 10 |
| 2 | 11-50 |
| 3 | 51-90 |
| 4 | 91-200 |

Con el fin de obtener los valores correspondientes al número de espermatozoides totales para cada grado de aglutinación, y así obtener el porcentaje correspondiente a cada grado, se multiplicaron los aglutinados de grado 1 por 10, el grado 2 por 50, el grado 3 por 90 y el grado 4 por 200, que corresponden al número mayor de espermatozoides que conforman cada grado de aglutinación del 1-4 como se puede ver en la tabla 1. Esto se realizó para los grupos control, y todos los tratamientos. En el caso de los espermatozoides libres (grado 0), se dejó el valor intacto.

8.12 Análisis estadístico

Para minimizar la variación entre las muestras, se realizó el análisis utilizando el conjunto de datos obtenidos en cada experimento. En las gráficas y tablas, los datos se presentan como media \pm la desviación estándar. Adicionalmente en las gráficas se senañala si presentan diferencias significativas los grupos tratados respecto al control. En la tabla 2 se declaran las variables del diseño experimental.

Tabla 2 Declaración de variables y unidades.

| Variables independientes | Unidades | Variables de Respuesta | Unidades |
|---|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| Concentración de PFOA, PFOS, Cu²⁺ y D-PEN | Micromolar | Viabilidad | % |
| | | Capacitación | % |
| | | Aglutinación | % |

El modelo Probit es 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). Se utilizó para determinar la concentración más probable de mortalidad del cincuenta por ciento de la muestra de espermatozoides (CL50) en los experimentos de viabilidad; así como también el cincuenta por ciento de inhibición de la capacitación de espermatozoides (CIC50) al ser tratados con PFOA y PFOS.

El modelo estadístico de Probit utilizado se adaptó a un diseño experimental completamente aleatorio, en el cual se incubaron sin o con concentraciones crecientes de PFOA y/o PFOS con 8 repeticiones independientes, cada una por duplicado. Las variables de respuesta fueron mortalidad y capacitación.

Modelo estadístico

Regresión de Probit (Ecuación 6).

Ecuación 6. Regresión de Probit. Tomada de (NCSS, 2021).

$$P = \alpha + \beta[\log_{10}(Dosis)]$$

P= es cinco más la transformada normal inversa de la tasa de respuesta

α = valor estimado de la intersección, con su error asociado

β = valor estimado de la pendiente, con su error estándar asociado

La prueba ANOVA se utilizó para poder determinar si existen diferencias significativas entre las medias de las respuestas de los grupos de espermatozoides tratados con PFOA o PFOS, a las concentraciones estudiadas, comparándolas con las del grupo control. Se utilizaron los análisis estadísticos ANOVA y Tukey para un diseño experimental completamente aleatorio en el que se incubaron las muestras de espermatozoides con concentraciones crecientes de PFOA o PFOS con 8 repeticiones por duplicado. Las variables de respuesta fueron mortalidad y capacitación. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio, en el cual las muestras de espermatozoides se incubaron con PFOA, PFOS, Cu^{2+} , adicionalmente se suplementados con D-PEN a diferentes tiempos con 3 repeticiones por duplicado. La variable de respuesta fue la aglutinación, clasificada en sus diferentes grados.

Modelo estadístico

Análisis de varianza de un vía (ANOVA) (Ecuación 7).

Ecuación 7. ANOVA. Tomada y modificada de (Devore, 2016).

$$X_{ij} = \mu + \tau_j + e_{ij}; \quad i = 1, 2, \dots, n_j, j = 1, 2, \dots, k$$

X_{ij} = la j-ésima observación del i-ésimo tratamiento

μ = la gran media, representa la media de todas las k -medias poblacionales

τ_j = efecto del tratamiento, representa la diferencia entre la media de la j-ésima población y la gran media

e_{ij} = término del error, representa la cantidad en la que difiere una medición individual de la media poblacional a la que pertenece

Una vez que se determinó que existen diferencias entre las medias, las pruebas de rango post hoc permitieron determinar qué medias fueron diferentes, identificando subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí. Aunque existen varias pruebas post hoc, la de Tukey es una de las más utilizadas porque es adecuada para un rango elevado de comparaciones. Por lo tanto, se realizó una prueba de Tukey para determinar qué grupos tratados mostraron diferencias respecto al control utilizando una $p < 0.05$.

Modelo estadístico

Método de Tukey (método de diferencia verdaderamente significativa) (Ecuación 8).

Ecuación 8. Tukey o HSD. Tomada y modificada de (Devore, 2016).

$$HSD = q_{\alpha, m, N-m} \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

HSD= diferencia verdaderamente significativa
q=estadística de amplitud de Student
 α =nivel de significación seleccionado
 m =número de medias en el experimento
N=cantidad total de observaciones
 n = número de observaciones en el tratamiento
MSE=media de los cuadrados del error

9. Resultados y Discusión

Los PFCs se han asociado a diferentes patologías que repercuten en la salud del ser humano (Fenton et al., 2021; United States Environmental Protection Agency, 2021). Esto debido a probables interacciones, regulaciones desde la expresión de genes hasta la producción de proteínas involucradas en la señalización, transportadoras, enzimas, etc. Una alteración en la regulación de los procesos celulares provocada por sustancias dañinas desregulará el sistema desencadenando patologías e inclusive podría conllevar a la muerte de ciertas células para salvar al organismo (Franco et al., 2020; Xu et al., 2020). El presente trabajo se enfocó en tratar de explicar el mecanismo que provoca la generación de aglutinación en células espermáticas al estar en presencia de dos PFCs (PFOA y PFOS) durante el proceso de capacitación espermática *in vitro*. Las muestras utilizadas estuvieron dentro de los parámetros previamente descritos en muestras de espermatozoides de cerdo (González-Urdiales et al., 2006).

9.1 Efecto de los perfluorados en la viabilidad de espermatozoides de cerdo

Se evaluó el efecto de los perfluorados PFOA y PFOS determinando la mortalidad espermática. Se encontró que los PFCs dañan a los espermatozoides, observándose que PFOA a 500 y 1000 μM no incrementó la mortalidad respecto al control (figura 6); a partir de concentraciones mayores a 1000 μM (1500-2500 μM), aumentó la mortalidad a más del doble (figura 6) siendo significativas ($p < 0.05$).

Mediante la aplicación de la prueba de PROBIT, se calculó la CL₅₀ para PFOA la cual corresponde a 1894 μ M, encontrándose dentro del intervalo reportado previamente por (Hernández-Ojeda, 2017).

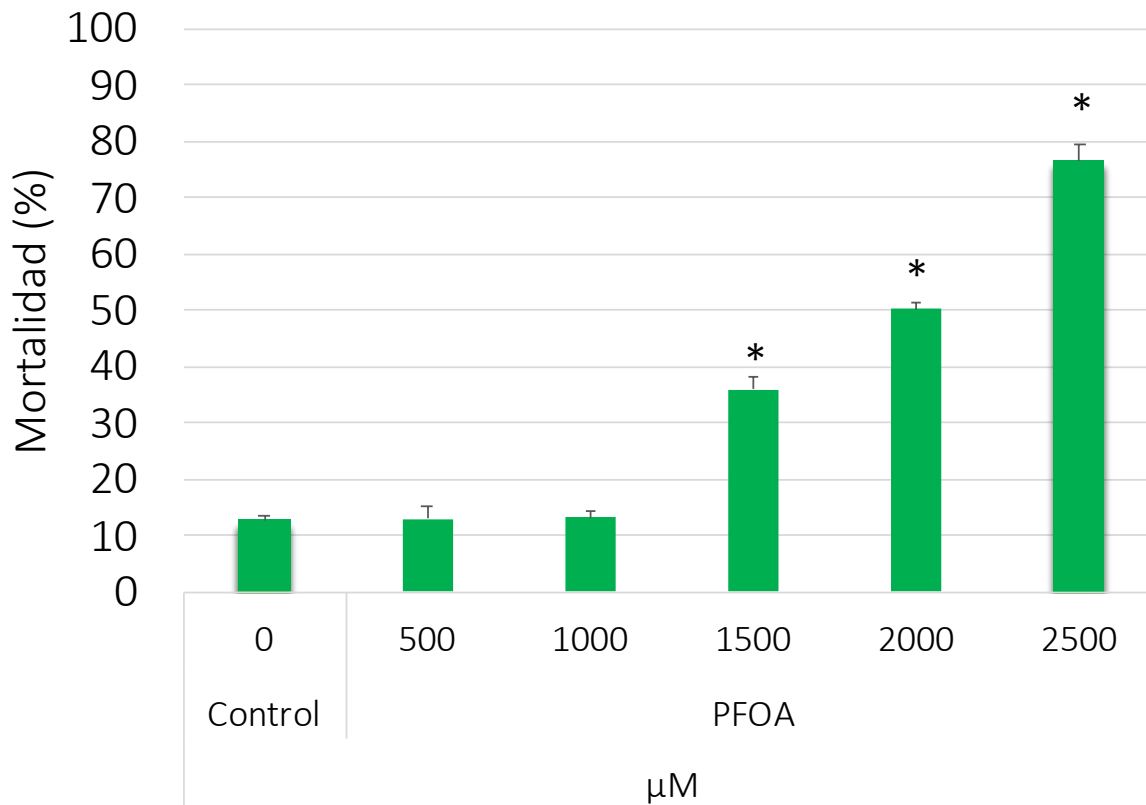


Figura 6. Mortalidad de espermatozoides de cerdo producida por PFOA. * corresponde a diferencias significativas con respecto al control; $p < 0.05$; media \pm desviación estándar (DE); $n = 8$.

Con PFOS se observó un aumento significativo de la mortalidad de espermatozoides de casi el doble desde la concentración de 1000 μ M; el porcentaje de mortalidad de

espermatozoides a 2000 y 3000 μM de PFOS, se elevó alcanzando valores cercanos a 90 y 100 %, respectivamente (figura 7). La CL_{50} calculada mediante la prueba PROBIT fue de 460 μM , lo cual corresponde con lo reportado por Ortiz-Sánchez (2017) y Oseguera-López (2020). Este incremento en la mortalidad observado por PFOA a concentraciones mayores de 1000 μM y PFOS incluso a bajas concentraciones probablemente puede ser debido a que provocan una alteración a nivel mitocondrial, mediando las vías de señalización de inducción de apoptosis reportado en presencia de PFOA y PFOS (Xu et al., 2018; Xu et al., 2019); esto debido a que favorecen que el anión superóxido tienda a formar un intermediario menos reactivo como lo es el H_2O_2 que a su vez lleva a la formación de O_2 y agua, todo esto mediante la participación de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa, sin embargo se ha visto que ambos compuestos perfluorados provocan una disminución en su actividad generando incremento de las EROS así como pérdida del potencial de membrana mitocondrial conllevando a la activación de la caspasa 9 (Li et al., 2017; Xu et al., 2018; Xu et al., 2019).

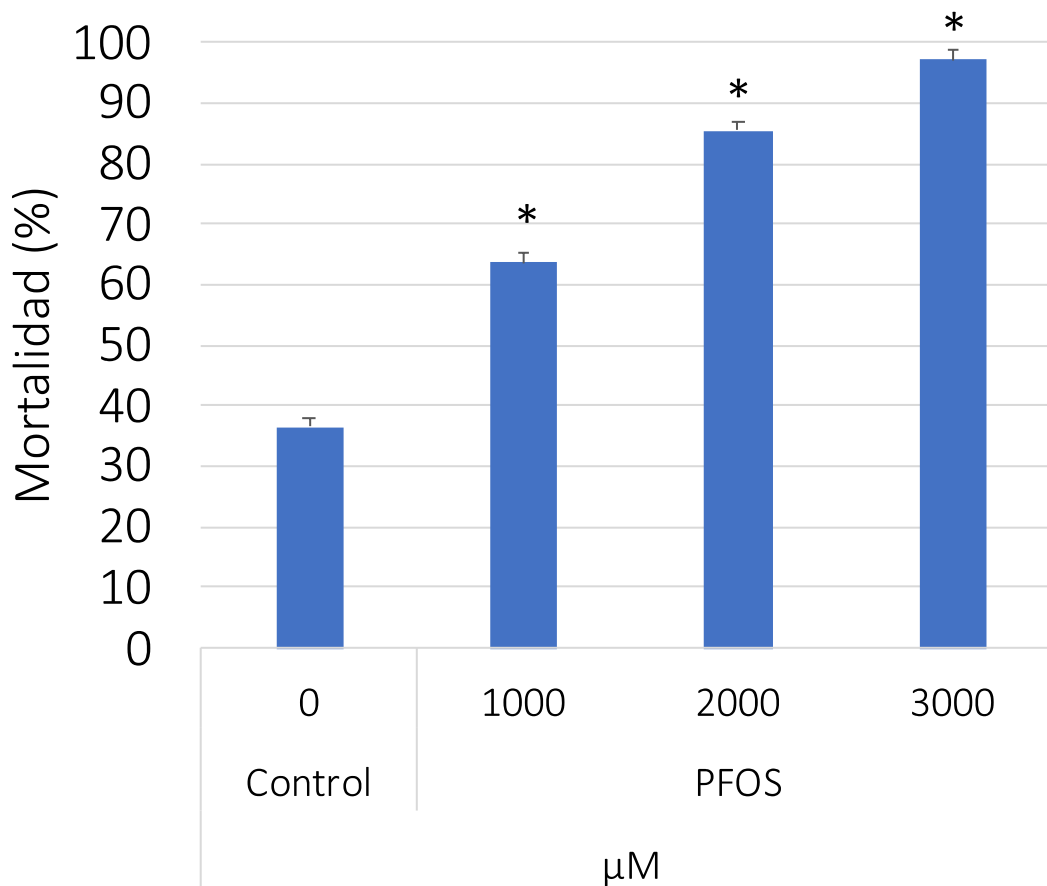


Figura 7. Mortalidad de espermatozoides de cerdo producida por PFOS. * corresponde a diferencias significativas con respecto al grupo control; $p < 0.05$; media \pm DE; $n = 8$.

9.2 Efecto de los perfluorados PFOA y PFOS en el proceso de capacitación de espermatozoides de cerdo

La capacitación espermática es un proceso en el que ocurren cambios fisiológicos y bioquímicos para adquirir su capacidad fertilizante (Bernecic, Gadella, et al., 2019;

Bernecic, Zhang, et al., 2019). La inhibición de este proceso puede repercutir negativamente en la fertilidad. El uso de la tinción con CTC nos permitió determinar el porcentaje de espermatozoides capacitados, cuya importancia radica en que existe una relación directamente proporcional entre el patrón de espermatozoides capacitados y la fertilidad (Kwon et al., 2015).

La adición del compuesto PFOA a concentraciones de 500 μM parece no alterar el proceso de capacitación *in vitro*, mientras que a concentraciones de 1000 y 2000 μM disminuye significativamente el proceso (figura 8), estos resultados concuerdan con los valores obtenidos de mortalidad, pues el valor de la CL_{50} es cercano a 2000 μM ; en la concentración de 3000 μM hay una considerable disminución que se relaciona directamente con la mortalidad obtenida a esa concentración. Mientras que para PFOS a partir de la concentración de 500 μM se presenta ya una disminución en el proceso de capacitación que puede estar relacionado con un incremento en la mortalidad espermática (figura 8). Se observa más pronunciada la disminución de la capacitación espermática a concentraciones mayores de 1000-3000 μM , pero consideramos que es debida a la alta mortalidad de los espermatozoides.

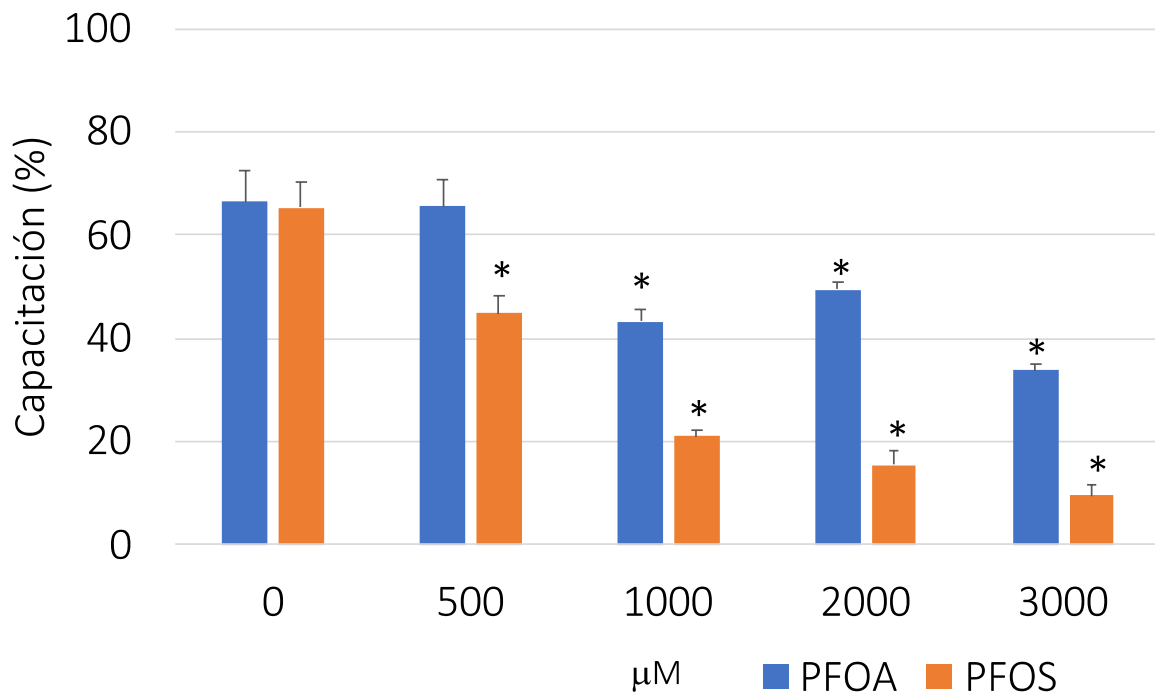


Figura 8. Proporción de espermatozoides de cerdo capacitados en presencia de PFOA y PFOS. * corresponde a las diferencias significativas con respecto al grupo control; $p < 0.05$; media \pm DE; $n = 3$.

Con base en estos datos y aplicando la prueba PROBIT, se determinaron los valores de las CIC_{50} para ambos PFCs siendo de 1458 μM para PFOA y para PFOS de 274 μM . A concentraciones mayores de 1000 μM en ambos PFCs, se observó un drástico decremento de la viabilidad, sin embargo, se decidió incluir estos valores porque permitieron calcular la CIC_{50} ; el valor de la CIC_{50} fue útil porque es la concentración en la cual se inhibe la capacitación en la mitad de la población de espermatozoides y permitió determinar el grado de afectación del proceso de capacitación ocasionado por ambos compuestos.

El proceso de capacitación es muy complejo, pero es de resaltar que se ve favorecido por la presencia de EROS y estos cambios que experimenta el espermatozoide para poder adquirir su capacidad fertilizante, en última instancia, dan paso a la muerte celular (Ruiz-Díaz et al., 2020), por lo que no es sorprendente que los resultados obtenidos en la presente investigación en relación a la disminución de la capacitación concuerdan con una disminución en la viabilidad espermática.

Se propone que la aglutinación generada en presencia o ausencia de PFOA y PFOS es favorecida por la participación de los grupos sulfhidrilo (-SH) que conllevan a la formación de grupos disulfuro (-S-S-) en presencia de EROS o de metales divalentes como el Cu^{2+} ; esta formación y/o mantenimiento de los -S-S- en ciertas proteínas o enzimas es necesario durante el proceso de la capacitación (Fleming et al., 1986).

En los siguientes experimentos, para evaluar la aglutinación, se utilizaron concentraciones de PFOA y PFOS que corresponden a un medio de la CL_{50} para PFOA y la CIC_{50} para PFOS, ya que a estas concentraciones el efecto en la mortalidad y en la capacitación es menor comparado con las concentraciones de 1000 μM o superiores.

9.3 Efecto de los perfluorados PFOA y PFOS en la aglutinación de espermatozoides de cerdo y el uso del D-penicilamina

La aglutinación podría estar relacionada con cambios en la membrana plasmática debidos a la inducción del proceso de capacitación mediante la incubación en un medio de capacitación enriquecido con ciertas moléculas provocando la formación de

aglutinados como bicarbonato y albúmina (Harayama et al., 2003; Leahy et al., 2016b); PFOA y PFOS provocaron un incremento y disminución de los aglutinados en cuanto a tamaño y cantidad, respectivamente (Hernández-Ojeda, 2017; Ortiz-Sánchez, 2017). Hay estudios que demuestran que los grupos sulfhidrilo -SH de residuos de cisteínas libres podrían favorecer o regular la formación de aglutinados de espermatozoides de carnero en presencia de Cu^{2+} (Leahy et al., 2016a).

Se evaluó la aglutinación espermática clasificándola de acuerdo con los diferentes grados de aglutinación del 0-4 (Tabla 1). Se utilizaron las siguientes concentraciones para los tratamientos: control, PFOA (950 μM), PFOS (274 μM) y Cu^{2+} (10 μM), solos o con la adición D-PEN (1 mM) al inicio de la incubación o tres y media horas después. El grupo control presentó todos los tipos de aglutinados, sin embargo, se presentan mayoritariamente aglutinados tipo rosetas (grado 1) y aglutinados pequeños (grado 2) (figuras 9 a y 10, tabla 3) lo cual se relaciona con lo reportado previamente indicando que el bicarbonato de sodio favorece esta aglutinación en medios de capacitación en espermatozoides de carnero y cerdo (Harayama et al., 2004; Leahy et al., 2016b).

Por otra parte, la adición de Cu^{2+} provocó un incremento en un 10 % en la formación de aglutinados pequeños (grado 2) respecto del control, una disminución de los aglutinados grandes (grado 4) presentando un 2.5 % en los grupos tratados con Cu^{2+} , sin embargo, no se obtuvieron diferencias con respecto al control (figuras 9 b y 10, tabla 3); por otro lado, se observó la pérdida total de todo tipo de movimiento en los espermatozoides aglutinados y no aglutinados. La pérdida de la movilidad espermática mediada por el Cu^{2+} se debe probablemente a una alteración en los grupos sulfhidrilo de las proteínas del axonema que son ricas en estos grupos como por ejemplo las

fibras densas externas (ODF1); lo anterior, asociado con un incremento en las especies reactivas de nitrógeno (ERN) específicamente peroxinitrito (ONOO^-), que pueden alterar también a los microtúbulos, Ca^{2+} -ATPasas, etc. del flagelo (Cabrillana et al., 2016).

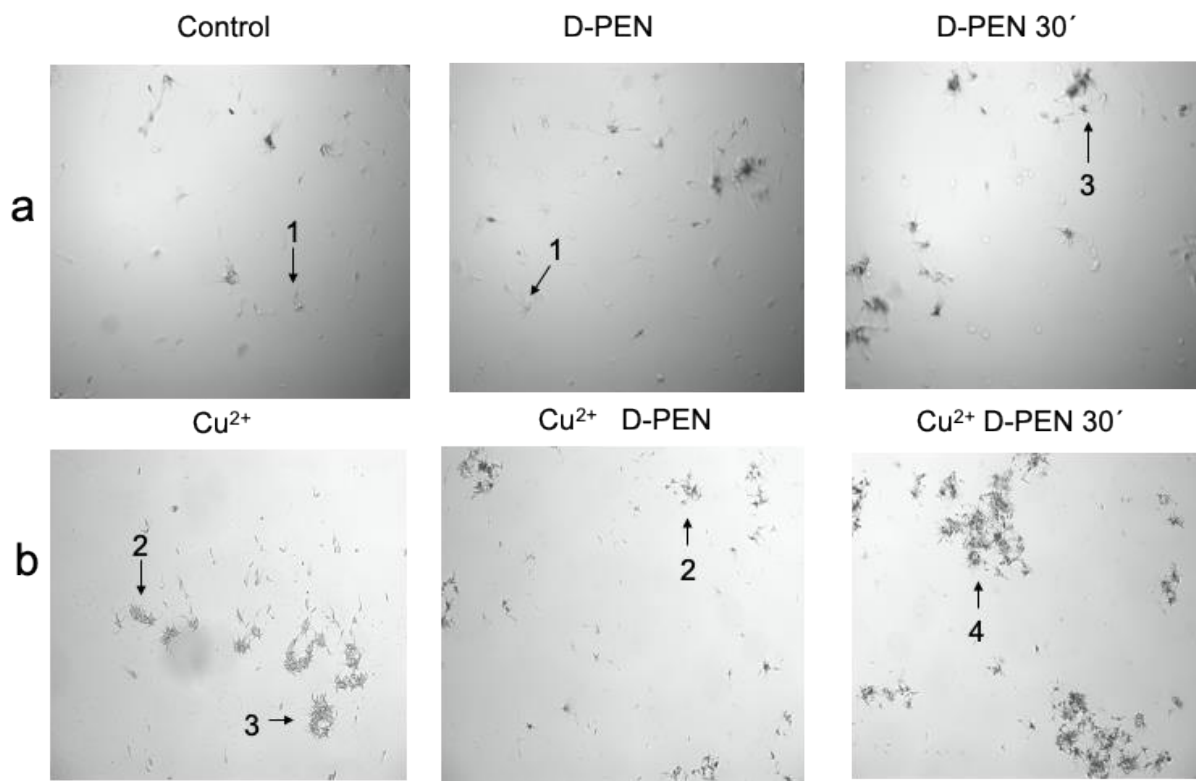


Figura 9. Imágenes representativas de aglutinados de espermatozoides de cerdo. **a**, grupo control, y grupos con D-PEN adicionado desde el inicio o 30 minutos antes de finalizar las 4 horas del proceso de capacitación *in vitro*; **b**, grupo con Cu^{2+} y Cu^{2+} D-PEN a 4 horas o 30 minutos antes de finalizar el proceso de capacitación *in vitro*. Se ejemplifican con flechas los grados de aglutinación observados; el grado 0 no se señala pues se refiere a espermatozoides libres; $n=3$. Imágenes tomadas utilizando microscopía de contraste de fases a 100 X.

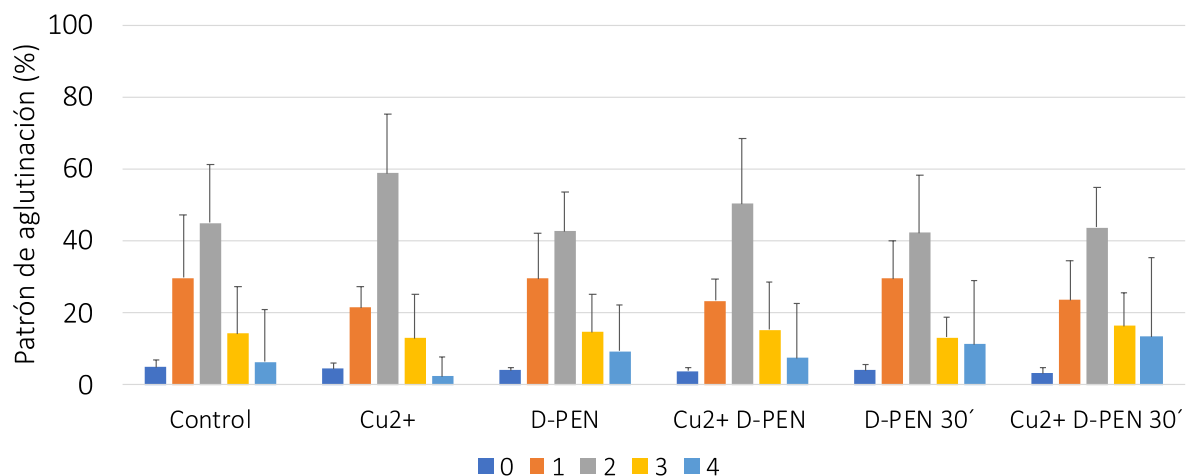


Figura 10. Proporción de grados de aglutinación (0-4) de espermatozoides de cerdo en presencia de Cu²⁺ y D-PEN. Grupo Control; Cu²⁺; D-PEN por 4 horas; Cu²⁺ D-PEN por 4 horas; D-PEN 30', adicionado 30 minutos antes de las 4 horas de capacitación; Cu²⁺ D-PEN 30', adicionado 30 minutos antes de las 4 horas de capacitación. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control; p<0.05; media ± DE; n=3.

Tabla 3. Proporción de espermatozoides de cerdo por grado de aglutinación (0-4) en el grupo control y en presencia de Cu²⁺ y D-PEN por 30' y 4h; media ± DE; n=3.

| Tratamiento | Porcentaje de aglutinación | | | | |
|----------------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 4.8 ± 2.2 | 29.7 ± 17.4 | 45 ± 16.3 | 14.2 ± 13 | 6.4 ± 14.3 |
| Cu ²⁺ | 4.4 ± 1.4 | 21.5 ± 5.9 | 58.9 ± 16.3 | 12.9 ± 12.1 | 2.3 ± 5.2 |
| D-PEN | 4 ± 0.7 | 29.5 ± 12.6 | 42.6 ± 10.8 | 14.6 ± 10.4 | 9.3 ± 12.8 |
| Cu ²⁺ D-PEN | 3.8 ± 0.9 | 23.2 ± 6.3 | 50.3 ± 18.2 | 15.3 ± 13.3 | 7.4 ± 15.1 |
| D-PEN 30' | 4 ± 1.4 | 29.4 ± 10.6 | 42.2 ± 16.3 | 13.2 ± 5.5 | 11.2 ± 17.6 |
| Cu ²⁺ D-PEN 30' | 3.2 ± 1.6 | 23.5 ± 10.9 | 43.8 ± 10.9 | 16.3 ± 9.1 | 13.2 ± 2 |

La adición de D-PEN por 4 h mostró una ligera disminución de los aglutinados pequeños (grado 2) respecto al control, pero hubo un aumento del doble en los aglutinados de grado 4; sin embargo, al comparar los dos grupos de D-PEN (incubado por 4 h) y D-PEN 30' (adicionado a 3.5 h después de iniciar el proceso de capacitación), se notó una disminución de los aglutinados de grado 4 con D-PEN 4h (figuras 9 a y 10, tabla 3). Aunque en los resultados de incubación con D-PEN no se observó una disminución significativa de los aglutinados con respecto al grupo control, se observó una tendencia a la disminución, lo cual concuerda con lo reportado en espermatozoides de carnero incubados en presencia de D-PEN, pues se observó que ayudó a evitar la formación de aglutinados y también propició su disgregación (Leahy et al., 2016b); esto nos llevó a pensar que probablemente en espermatozoides de cerdo se necesita usar una concentración mayor de D-PEN, para poder apreciar un efecto contundente en la disminución de aglutinados (figura 10 y tabla 3).

Al adicionarse D-PEN en conjunto con Cu^{2+} (incubación 4 h), se apreció una disminución de los aglutinados tipo roseta (grado 1) y un aumento de los aglutinados pequeños (grado 2) con respecto al control; la incubación de Cu^{2+} D-PEN 30' mostró un comportamiento similar al grupo D-PEN por 4h; mientras que con el grupo Cu^{2+} D-PEN 30' hubo una disminución de los aglutinados pequeños (grado 2) y un incremento en los aglutinados grandes (grado 4) respecto al grupo control (figuras 9 b y 10, tabla 3). Aitken (2017) menciona que el Cu^{2+} al interactuar con D-PEN, favorece un incremento de EROS, siendo el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) el que genera un incremento en la oxidación de grupos sulfhidrilo libres, lo que favorece la formación de los aglutinados grandes (grado 4) como observamos en los grupos D-PEN con Cu^{2+} . Este incremento

parece estar mediado por la participación del Cu^{2+} y de los aniones superóxido (O_2^-), favoreciendo que los radicales libres ataquen a los grupos sulfhidrilo, generando la formación de enlaces disulfuro.

Es importante resaltar que se observó una recuperación de la movilidad espermática progresiva en ambas condiciones por 4h y 30 minutos antes de que termine la capacitación, lo cual concuerda con lo reportado por Ruiz-Díaz y colaboradores (2020), quienes observaron que la presencia de D-PEN provee de una mejora en la movilidad hiperactiva en espermatozoides de caballo.

Por otra parte, Letelier y colaboradores (2005) señalan de que el Cu^{2+} favorece su interacción con proteínas, debido a su alta afinidad con grupos amino y/o -SH libres. Lo cual sugiere que efectivamente los grupos -SH son los que favorecen las aglutinaciones espermáticas, esto debido a un incremento de los aglutinados pequeños (grado 2) en presencia de Cu^{2+} (figura 10 y tabla 3) respecto al control, observándose un efecto similar con PFOA (figura 11 y tabla 4).

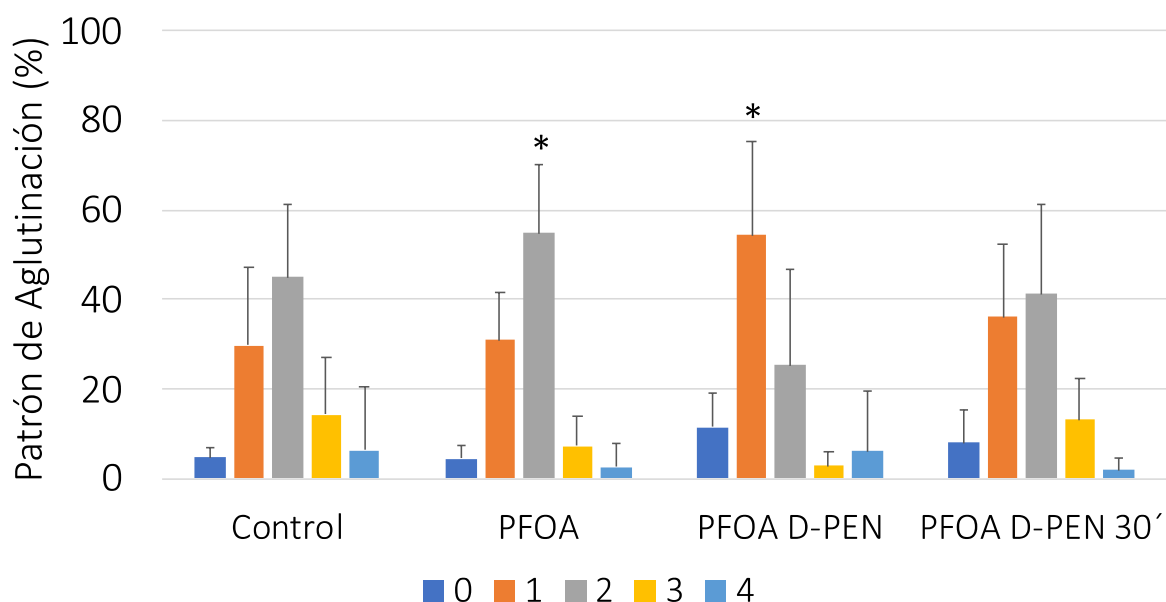


Figura 11. Proporción de grados de aglutinación (0-4) de espermatozoides de cerdo en presencia de PFOA y D-PEN. Grupo Control; PFOA; PFOA D-PEN por 4 horas; PFOA D-PEN 30', adicionado 30 minutos antes de las 4 horas de capacitación. *diferencias significativas respecto al grupo control; $p < 0.05$; media \pm DE; $n=3$.

Tabla 4. Proporción de espermatozoides de cerdo por grado de aglutinación (0-4) en presencia de PFOA y D-PEN por 30' y 4h; media \pm DE; $n=3$.

| Tratamiento | Porcentaje de aglutinación | | | | |
|----------------|----------------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 4.8 \pm 2.25 | 29.7 \pm 17.37 | 45 \pm 16.33 | 14.2 \pm 13 | 6.4 \pm 14.29 |
| PFOA | 4.5 \pm 2.91 | 31 \pm 10.35 | 54.7 \pm 15.58 | 7.2 \pm 6.71 | 2.6 \pm 5.11 |
| PFOA D-PEN | 11.6 \pm 7.36 | 54.2 \pm 20.83 | 25.4 \pm 21.45 | 2.8 \pm 3.33 | 6.1 \pm 13.55 |
| PFOA D-PEN 30' | 7.9 \pm 7.44 | 36.1 \pm 16.08 | 41.1 \pm 19.98 | 13 \pm 9.24 | 1.8 \pm 2.95 |

Letelier y colaboradores (2005) mencionan que el Cu^{2+} media la reacción de Fenton o Haber-Weiss creando un incremento en la toxicidad a nivel celular mediante la producción de EROS. Existe una relación entre el incremento de EROS y una alteración en las enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), el cual se percibió en presencia de PFOS y PFOA (Xu et al., 2018; Xu et al., 2019). Esto indica que probablemente el efecto negativo en la viabilidad espermática a altas concentraciones de PFOA y en PFOS es debido a un incremento en la producción de EROS, mediante la posible inhibición de las enzimas antioxidantes CAT y SOD.

PFOA generó un incremento de los aglutinados pequeños (grado 2) siendo significativo ($p < 0.05$) y una disminución de los aglutinados medianos y grandes (grados 3 y 4) con respecto al grupo control (figura 11 y 12 a, tabla 4). La adición del compuesto D-PEN en conjunto con PFOA desde el inicio, favoreció un incremento de los aglutinados (grado 1) siendo significativo a $p < 0.05$, así como un incremento de los espermatozoides libres (grado 0), y una disminución de los aglutinados pequeños (grado 2) y de los aglutinados medianos (grado 3) con respecto al grupo control, e incluso con respecto al grupo de PFOA (figuras 11 y 12 a, tabla 4).

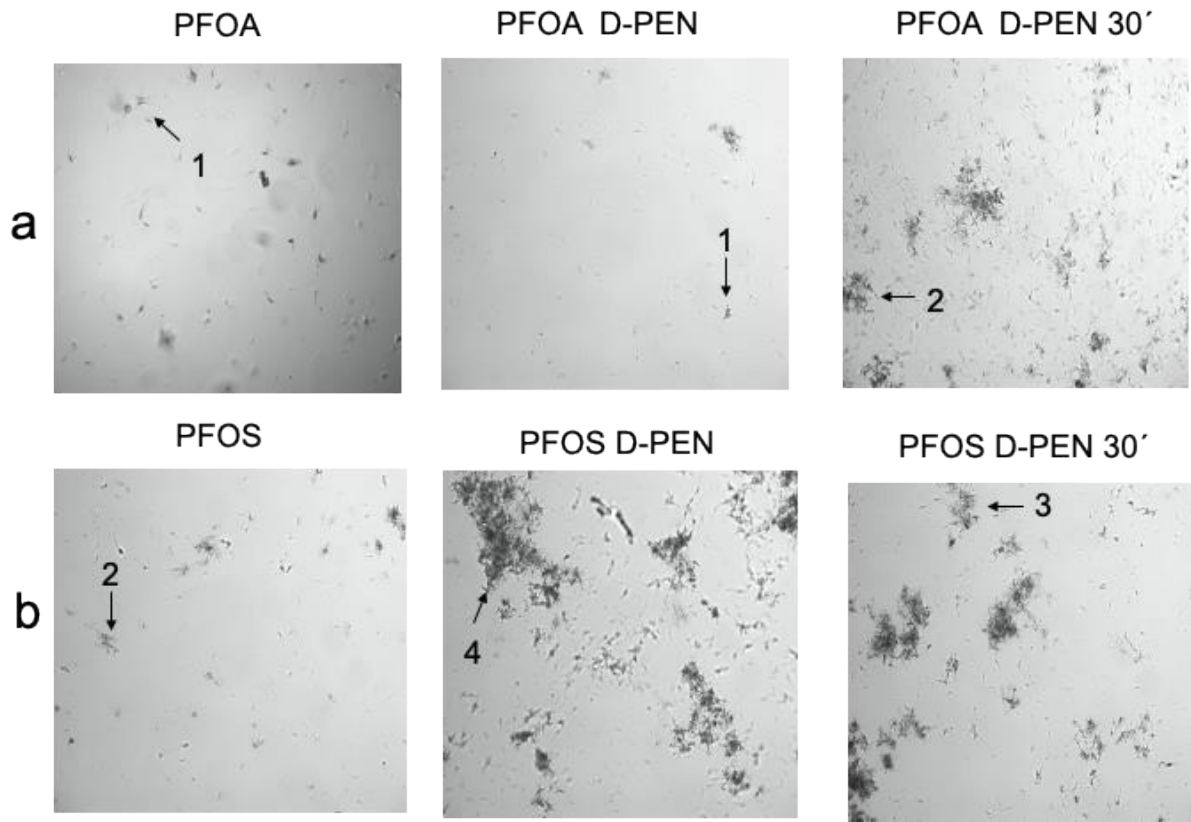


Figura 12. Imágenes representativas de aglutinados de espermatozoides de cerdo. **a**, grupo con PFOA y PFOA D-PEN adicionado desde el inicio o 30 minutos antes de finalizar las 4 horas del proceso de capacitación *in vitro*; **b**, grupo con PFOS y PFOS D-PEN a 4 horas o 30 minutos antes de finalizar el proceso de capacitación *in vitro*. Se ejemplifican con flechas los grados de aglutinación observados; el grado 0 no se señala pues se refiere a espermatozoides libres; n=3. Imágenes tomadas utilizando microscopía de contraste de fases a 100 X.

Con la adición de D-PEN a 3.5 h de incubación con PFOA, se observó una ligera disminución de los aglutinados rosetas, pequeños y grandes (grados 1, 2 y 4) con respecto al control, pero una disminución de los aglutinados pequeños (grado 2) respecto a PFOA (figura 11 y tabla 4). Esto nos indica que la adición de D-PEN desde el inicio con PFOA ayuda a disminuir la aglutinación favoreciendo la formación de

aglutinados (grado 1), pero que la presencia de D-PEN por solo 30 minutos (añadido a 3.5 h de incubación con PFOA) es suficiente para inhibir un incremento de los aglutinados pequeños (grado 2), manteniendo un patrón de aglutinación similar al control. Estos resultados con la adición de D-PEN al grupo con PFOA coinciden con las interpretaciones de Leahy y colaboradores (2016a) quienes sugieren que la D-PEN inhibe la aglutinación si se adiciona desde el principio y reduce los aglutinados previamente formados. Esto nos sugiere nuevamente la implicación de los grupos -SH en la aglutinación espermática mediada por PFOA que habíamos sugerido con la presencia de Cu^{2+} ; proponiendo que PFOA interacciona con los grupos -SH del compuesto D-PEN favoreciendo la formación de aglutinados (grado1) y una disminución de los aglutinados (grado 2). PFOA favorece la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes generando un incremento en las EROS, al igual que Cu^{2+} provoca un incremento en las EROS; este último también cataliza la interacción con los grupos sulfhidrilo libres (Leahy et al., 2016a; Xu et al., 2018; Xu et al., 2019). Por otra parte, PFOS a la concentración de 274 μM , generó un ligero incremento de los aglutinados medianos (grado 3), así como una disminución de los aglutinados tipo rosetas (grado1) mientras que los otros grupos de aglutinados se mantuvieron igual con respecto al grupo control (figuras 12 b y 13, tabla 5). Esto difiere de lo observado con la incubación con el compuesto PFOA pues se observó el efecto contrario.

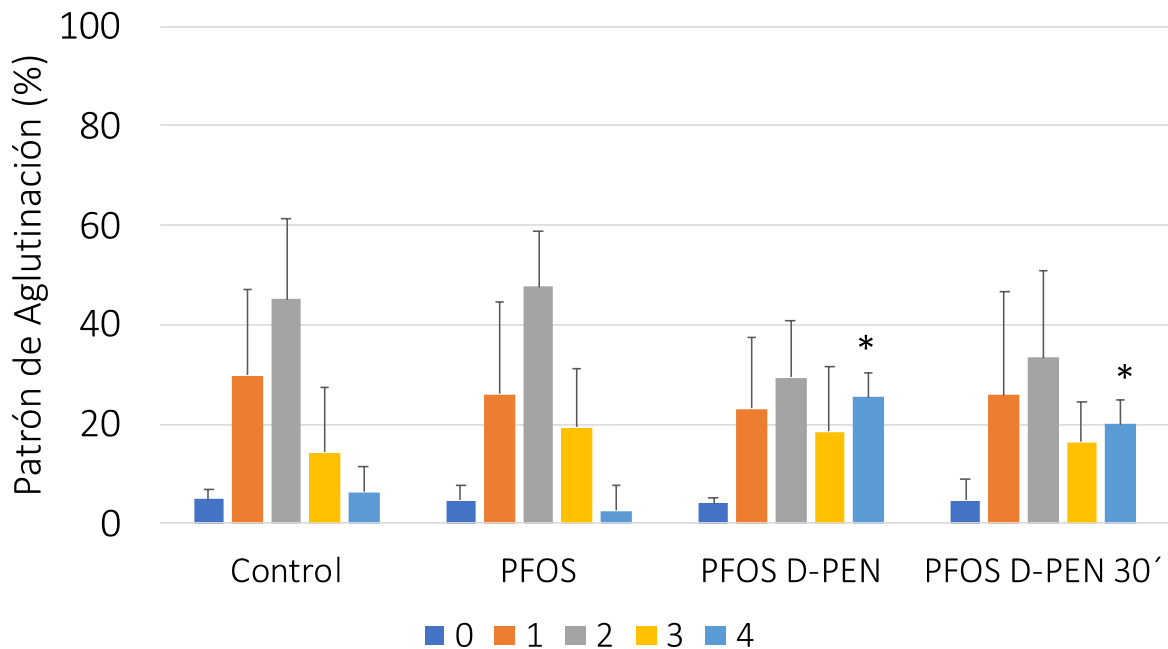


Figura 13. Proporción de grados de aglutinación (0-4) de espermatozoides de cerdo en presencia de PFOS y D-PEN. Grupo Control; PFOS; PFOS D-PEN por 4 horas; PFOS D-PEN 30', adicionado 30 minutos antes de las 4 horas de capacitación. *diferencias significativas respecto al grupo control; $p < 0.05$; media \pm DE; $n = 3$.

Al incubar con PFOS y D-PEN desde el principio, se observó que se favorece un incremento de los aglutinados medianos y grandes (grados 3 y 4), y la diferencia fue significativa en el grado 4 ($p < 0.05$); también se observó una disminución de los aglutinados tipo roseta y los pequeños (grado 1 y 2, respectivamente); al compararse con el grupo PFOS, se observó un incremento de los aglutinados grandes (grado 4) y una disminución de los aglutinados pequeños (grado 2). Pero al adicionar D-PEN por 30 minutos solamente en conjunto con PFOS, se observó un efecto similar al que presenta D-PEN con PFOS por cuatro horas, pero con un menor incremento de los

aglutinados grandes (grado 4) y disminución de aglutinados pequeños (grado 2). En referencia con el control se observó un incremento de los aglutinados grandes (grado 4) y disminución de los aglutinados pequeños (grado 2) (figura 13 y tabla 5).

Tabla 5. Proporción de espermatozoides de cerdo por grado de aglutinación (0–4) en presencia de PFOS y D-PEN por 30' y 4h; media \pm DE; n=3.

| Tratamiento | Porcentaje de aglutinación | | | | |
|----------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 4.8 \pm 2.2 | 29.7 \pm 17.4 | 45 \pm 16.3 | 14.2 \pm 1 | 6.4 \pm 14.3 |
| PFOS | 4.5 \pm 3.3 | 26.1 \pm 18.4 | 47.5 \pm 11.4 | 19.3 \pm 12.1 | 2.5 \pm 5.7 |
| PFOS D-PEN | 4 \pm 1.1 | 23.1 \pm 14.3 | 29.3 \pm 11.6 | 18.4 \pm 13.2 | 25.3 \pm 21 |
| PFOS D-PEN 30' | 4.5 \pm 4.4 | 25.9 \pm 20.7 | 33.4 \pm 17.5 | 16.3 \pm 8.3 | 19.9 \pm 21.8 |

Inicialmente se esperaba que PFOS incrementara la formación de aglutinados en todos los grados a 274 μ M, pero solo se observó un incremento de los aglutinados medianos (grado 3) (figura 13), observándose un efecto contrario a PFOA que favorece la formación de aglutinados pequeños (grado 2). Se esperaba también una disminución de los aglutinados con PFOS al adicionar D-PEN, como se observó con el grupo PFOA D-PEN que disminuyó los aglutinados pequeños (grado 2) y provocó la formación de aglutinados roseta (grado 1). Efectivamente, PFOS D-PEN también disminuyó los aglutinados pequeños (grado 2) pero incrementó significativamente los

aglutinados grandes (grado 4) (figura 13), mismo incremento que se observó con D-PEN y Cu^{2+} adicionado con D-PEN. Esto tal vez se debe a que D-PEN puede actuar ejerciendo una acción quelante de Cu^{2+} que conllevaría a la inactivación de enzimas antioxidantes como la $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn-SOD}$, generando un incremento de EROS favoreciendo la oxidación de los grupos sulfhidrilo; esto podría incrementar la formación de enlaces disulfuro generando la formación de los aglutinados grandes (grado 4). Esto se sustenta en lo reportado por otros autores que encontraron que PFOA y PFOS favorecen la inactivación de enzimas antioxidantes como la catalasa y SOD favoreciendo la formación de EROS, por lo que PFOS y D-PEN combinados, generaron un incremento de EROS y, por ende, alteraciones en los grupos -SH libres (Xu et al., 2018; Xu et al., 2019).

9.4 Efecto de los perfluorados PFOA y PFOS en conjunto con DTT sobre la aglutinación espermática.

El DTT es un potente agente reductor cuya principal acción es reducir enlaces disulfuro de una proteína y formar un enlace disulfuro mixto entre la proteína y el reactivo. Un efecto similar sucede con D-PEN, siendo solo una de las características de otras que posee. El enlace disulfuro es un enlace covalente que se produce cuando dos grupos -SH reaccionan formando un puente disulfuro. Al igual que con D-PEN, se observaron cambios en la aglutinación generada por PFOA y PFOS; se encontró que el DTT a 0.1 mM (figura 14) provocó un efecto desaglutinante en presencia de PFOA y PFOS incluso mejor que el propio D-PEN presente por 4 h o solo por 30´.

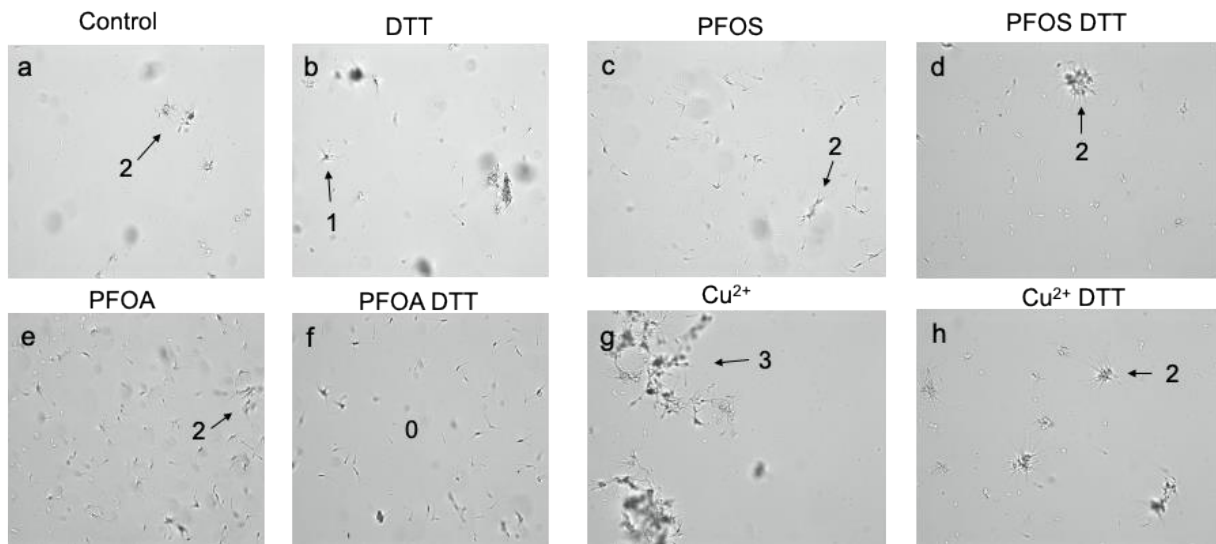


Figura 14. Imágenes representativas de aglutinados de espermatozoides de cerdo observados con cada uno de los tratamientos: **a**, grupo control; **b**, grupo con DTT; **c**, grupo con PFOS; **d**, grupo con PFOS DTT; **e**, grupo con PFOA; **f**, grupo con PFOA DTT; **g**, grupo con Cu^{2+} ; **h**, grupo con Cu^{2+} DTT. Se ejemplifican con flechas los grados de aglutinación observados; n=1. Imágenes tomadas utilizando microscopía de contraste de fases a 100 X.

Se observó en el grupo control la presencia de aglutinados pequeños (grado 2) y de aglutinados de tipo roseta (grado 1) con una mínima cantidad de espermatozoides libres. Al añadir DTT se observó un incremento de los aglutinados pequeños (grado 2) y una disminución de los aglutinados tipo roseta (grado 1). En ambos grupos (control y DTT) no se observaron aglutinados medianos ni grandes (grados 3 y 4). Parece ser que tiene mejor efecto que D-PEN, pero hay que realizar más experimentos para determinar la concentración adecuada.

El grupo de espermatozoides en medio de capacitación adicionado con Cu^{2+} presentó todos los tipos de aglutinados principalmente se observó un incremento de aglutinados medianos (grado 3) y grandes (grado 4) con una disminución de los aglutinados pequeños (grado 2) y rosetas (grado 1) a casi la mitad de los observados en el grupo control en ambos casos. La adición de DTT en conjunto con Cu^{2+} favoreció la formación de aglutinados pequeños (grado 2) similar al control, además de una disminución de los aglutinados medianos (grado 3) a la mitad de los que presentó Cu^{2+} solamente y de los aglutinados roseta (grado 1) los cuales disminuyeron aproximadamente un 30 % respecto del control; en el grupo DTT con Cu^{2+} , no se observó la presencia de aglutinados grandes (grado 4).

PFOA presentó principalmente aglutinados pequeños (grado 2) siendo un 25 % menor que el grupo control, aproximadamente el doble de aglutinados roseta (grado 1) respecto al control, y un mínimo incremento de aglutinados medianos (grado 3). La adición de DTT con PFOA favorece la formación de aglutinados roseta (grado 1) aproximadamente un 60 % más que en el grupo control y un incremento de espermatozoides libres (grado 0) a casi el doble respecto del control. También se observó una disminución de aglutinados pequeños (grado 2) que llegó a ser un poco menos de la mitad con respecto a lo observado en el grupo control, con la pérdida total de aglutinados medianos (grado 3) respecto a PFOA.

PFOS presentó un incremento de aglutinados roseta (grado 1) a casi el doble del grupo control, la presencia de aglutinados medianos (grado 3), y una disminución del 25 % de los aglutinados pequeños (grado 2) respecto al control. La adición de DTT con PFOS generó un incremento de los aglutinados roseta (grado 1) siendo un poco más

del doble de los observados en el control, una disminución de aproximadamente 30 % de los aglutinados pequeños (grado 2) respecto al control, y un ligero incremento de los espermatozoides libres (grado 0).

En los espermatozoides en medio de capacitación adicionado con DTT se observó la formación de aglutinados roseta (grado 1) y una disminución considerable de los aglutinados pequeños (grado 2), de los medianos (grado 3) y de los grandes (grado 4), lo cual no se observó con D-PEN al incubarse con Cu^{2+} y PFOS. Esta ligera reducción en los aglutinados nos da indicio de que hay participación de los grupos -SH en la aglutinación espermática. Es importante aumentar el número de ensayos para tener resultados sólidos con el uso de DTT.

En estudios de espermatozoides de humano, se observó que la adición de DTT puede inhibir parcial o totalmente la producción de O_2^- y el proceso de capacitación (de Lamirande & Gagnon, 1998), quizá el uso de DTT generó una disminución de los aglutinados grandes (grado 4) que se observaron con Cu^{2+} .

10. Conclusiones

- PFOA y PFOS afectan la viabilidad espermática a concentraciones mayores a 1000 μM .
- Se determinó que la incubación con PFOA o PFOS provoca una disminución del 50 % de espermatozoides capacitados a la concentración de 1458 μM para PFOA y de 274 μM para PFOS.
- La adición de PFOA a la concentración de 950 μM favoreció la formación de aglutinados pequeños principalmente, y algo similar se observó con la adición de Cu^{2+} al medio de capacitación.
- La adición de PFOS a la concentración de 274 μM no mostró cambios en el porcentaje de aglutinación respecto al grupo control.
- La adición de D-PEN favoreció la formación de aglutinados grandes, sin embargo, al adicionarse PFOA favorece la formación de aglutinados tipo roseta.
- La adición de D-PEN con PFOS favoreció la formación de aglutinados grandes y algo similar se observó al adicionar D-PEN con Cu^{2+} .
- El uso de D-PEN y Cu^{2+} nos permitió incursionar en el mecanismo de la aglutinación de espermatozoides, pero estos resultados no son lo suficientemente robustos para determinar si los grupos -SH libres están involucrados en la aglutinación.
- El DTT mostró una tendencia a la disminución de los aglutinados grandes y pequeños, con un incremento en la formación de aglutinados tipo roseta, sin

embargo, hace falta realizar más ensayos para tener una conclusión sólida al respecto.

- El estudio de los mecanismos involucrados en la aglutinación espermática es necesario pues si bien es cierto que algunos tipos y cantidad de aglutinados se forman de manera normal durante el proceso de capacitación espermática, el exceso de aglutinados ocasiona problemas en la movilidad de los espermatozoides y repercute negativamente en su poder fecundante.

11. Perspectivas

Consideramos que, para abundar en el mecanismo de aglutinación espermática mediada por los PFCs, se deben realizar más experimentos con 5-iodoacetamido fluoresceína (5-IAF) y con el compuesto DTT, así como la adición de moléculas con capacidad antioxidante como es el GSH. Esto permitirá determinar si disminuye el efecto de aglutinación y ayudará a comprobar la participación de EROS, así como ver si igualmente están participando los grupos -SH.

12. Referencias bibliográficas

Abrahams, E., Chain, E., Baker, W., & Robinson, R. (1943). Penicillamine, a characteristic degradation product of penicillin. *Nature*, 151, 107.

- Aitken, R. J. (2017, Oct). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*, 84(10), 1039-1052.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22871>
- Ardon, F., Markello, R. D., Hu, L., Deutsch, Z. I., Tung, C. K., Wu, M., & Suarez, S. S. (2016, Oct). Dynamics of Bovine Sperm Interaction with Epithelium Differ Between Oviductal Isthmus and Ampulla. *Biol Reprod*, 95(4), 90.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140632>
- Awda, B. J., Mackenzie-Bell, M., & Buhr, M. M. (2009, Sep). Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod*, 81(3), 553-561.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076471>
- Beggs, K. M., McGreal, S. R., McCarthy, A., Gunewardena, S., Lampe, J. N., Lau, C., & Apte, U. (2016, Aug 1). The role of hepatocyte nuclear factor 4-alpha in perfluorooctanoic acid- and perfluorooctanesulfonic acid-induced hepatocellular dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol*, 304, 18-29.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.001>
- Berger, G. K., Smith-Harrison, L. I., & Sandlow, J. I. (2019, Jun). Sperm agglutination: Prevalence and contributory factors. *Andrologia*, 51(5), e13254.
<https://doi.org/10.1111/and.13254>
- Bernecic, N. C., Gadella, B. M., Leahy, T., & de Graaf, S. P. (2019, Oct 1). Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology*, 137, 56-66.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.038>

- Bernećić, N. C., Zhang, M., Gadella, B. M., Brouwers, J., Jansen, J. W. A., Arkesteijn, G. J. A., de Graaf, S. P., & Leahy, T. (2019, Jul 8). BODIPY-cholesterol can be reliably used to monitor cholesterol efflux from capacitating mammalian spermatozoa. *Sci Rep*, 9(1), 9804. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45831-7>
- Betancourt, M., Resendiz, A., & Fierro, E. C. (2006, Oct). Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reprod Toxicol*, 22(3), 508-512. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.03.001>
- Betarelli, R. P., Rocco, M., Yeste, M., Fernandez-Novell, J. M., Placci, A., Azevedo Pereira, B., Castillo-Martin, M., Estrada, E., Pena, A., Zangeronimo, M. G., & Rodriguez-Gil, J. E. (2018, Sep). The achievement of boar sperm in vitro capacitation is related to an increase of disrupted disulphide bonds and intracellular reactive oxygen species levels. *Andrology*, 6(5), 781-797. <https://doi.org/10.1111/andr.12514>
- Bhoumik, A., Saha, S., Payghan, P. V., Ghosh, P., & Dungdung, S. R. (2018, Sep). Localization of MIF-II on mammalian spermatozoa: A study revealing its structure, function and motility inhibitory pathway. *Int J Biol Macromol*, 116, 633-647. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.143>
- Biblow, C. A. (2016). So What Exactly Are PFOS and PFOA? *Long Island Land Use and Zoning*. <https://www.lilanduseandzoning.com/2016/10/03/so-what-exactly-are-pfos-and-pfoa/>
- Boerke, A., Brouwers, J. F., Olkkonen, V. M., van de Lest, C. H., Sostarić, E., Schoevers, E. J., Helms, J. B., & Gadella, B. M. (2013, Jan). Involvement of

- bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biol Reprod*, 88(1), 21. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101253>
- Bollwein, H., Petschow, K., Weber, F., Leiding, C., & Stolla, R. (2004, Jul-Aug). [The incidence of agglutination and its influence on sperm quality and fertility of boar semen]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 117(7-8), 327-333. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298061> (Untersuchungen über das Vorkommen von Agglutinationen und deren Einfluss auf die Spermaqualität und Fertilität beim Ebersperma.)
- Briz, M., & Fàbrega, A. (2013). The Boar Spermatozoon. In S. Bonet, I. Casas, W. V. Holt, & M. Yeste (Eds.), *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends* (pp. 3-47). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8_1
- Briz, M. D., Bonet, S., Pinart, B., & Camps, R. (1996). Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. *Animal Reproduction Science*, 43(4), 221-239. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01470-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01470-4)
- Briz, M. D., Bonet, S., Pinart, B., Egozcue, J., & Camps, R. (1995, Mar-Apr). Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J Androl*, 16(2), 175-188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559149>
- Burgos, M., Fornés, M., Gutiérrez, L., & Vincenti, A. (1992). El proceso de maduración del espermatozoide durante el tránsito epididimario. V Iberoamerican Congress of Cell Biology, Malaga.

- Cabrillana, M. E., Uribe, P., Villegas, J. V., Alvarez, J., Sanchez, R., & Fornes, M. W. (2016, Oct). Thiol oxidation by nitrosative stress: Cellular localization in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med*, 62(5), 325-334. <https://doi.org/10.1080/19396368.2016.1208782>
- Cañizares Macías, M., & Duarte Lisci, G. (2009). Fundamentos de Química Analítica, Teoría y ejercicios. *Facultad de Química, UNAM*.
- Carey, F. A. (2006). Alcoholes, Dioles y Tioles [ORGANIC CHEMISTRY] (J. A. Velázquez Arellano & V. González y Pozo, Trans.). In *Química orgánica* (sexta ed., pp. 632-672). Mc Graw Hill.
- Conejo-Nava, J., Fierro, R., Gutierrez, C. G., & Betancourt, M. (2003, Jul-Aug). Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Arch Androl*, 49(4), 287-295. <https://doi.org/10.1080/01485010390204931>
- de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1998, Nov 1). Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulfide groups on human sperm capacitation and superoxide production. *Free Radic Biol Med*, 25(7), 803-817. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00156-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00156-7)
- de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2003, Nov 15). Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med*, 35(10), 1271-1285. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00501-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00501-x)
- Ded, L., Dostalova, P., Dorosh, A., Dvorakova-Hortova, K., & Peknicova, J. (2010, Jul 13). Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 87. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-87>

- Devore, J. L. (2016). Análisis de varianza [Probability and Statistics for Engineering and the Sciences] (M. J. L. Cárdenas, Trans.). In C. Learning (Ed.), *PROBABILIDAD Y ESTADÍSTICA para ingeniería y ciencias* (Novena ed., pp. 409-436).
- Eidelman, C., & Lowry, J. A. (2016). D-Penicillamine. In J. Brent, K. Burkhart, P. Dargan, B. Hatten, B. Megarbane, & R. Palmer (Eds.), *Critical Care Toxicology* (pp. 1-7). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2_182-1
- Fenton, S. E., Ducatman, A., Boobis, A., DeWitt, J. C., Lau, C., Ng, C., Smith, J. S., & Roberts, S. M. (2021, Mar). Per- and Polyfluoroalkyl Substance Toxicity and Human Health Review: Current State of Knowledge and Strategies for Informing Future Research. *Environ Toxicol Chem*, 40(3), 606-630. <https://doi.org/10.1002/etc.4890>
- Fleming, A. D., Kosower, N. S., & Yanagimachi, R. (1986). Alteration of sperm thiol-disulfide status and capacitation in the guinea pig. *Gamete Research*, 13(2), 93-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.1120130202>
- Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000, Nov 10). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*, 1469(3), 197-235. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(00)00018-6)
- Franco, M. E., Sutherland, G. E., Fernandez-Luna, M. T., & Lavado, R. (2020, Jan 30). Altered expression and activity of phase I and II biotransformation enzymes in human liver cells by perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Toxicology*, 430, 152339. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152339>

- González-Urdiales, R., Tejerina, F., Domínguez, J., Alegre, B., Ferreras, A., Peláez, J., Bernal, S., & Cárdenas, S. (2006). Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. In S. Bonet (Ed.), *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino* (1 ed., pp. 19-38). Universitat de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. Girona, Spain.
- Harayama, H., Okada, K., & Miyake, M. (2003, Jan-Feb). Involvement of cytoplasmic free calcium in boar sperm: head-to-head agglutination induced by a cell-permeable cyclic adenosine monophosphate analog. *J Androl*, *24*(1), 91-99. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514089>
- Harayama, H., Sasaki, K., & Miyake, M. (2004, Oct). A unique mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced increase of 32-kDa tyrosine-phosphorylated protein in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, *69*(2), 194-204. <https://doi.org/10.1002/mrd.20099>
- Hernández-Ojeda, G. (2017). *Efecto del ácido perfluorooctanoico sobre el flujo del Ca²⁺ intracelular durante la capacitación in vitro de espermatozoides de cerdo doméstico* [info:eu-repo/semantics/masterThesis]. Universidad Autónoma Metropolitana. <https://doi.org/http://localhost/files/7p88cg523>
- Hess, R. A., & de Franca, R. L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol*, *636*, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1

- Holland, M. K., & White, I. G. (1982). Heavy metals and human spermatozoa: II. The effect of seminal plasma on the toxicity of copper metal for spermatozoa. *Int J Fertil*, 27(2), 95-99. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6126455>
- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J. A., García, A., Betancourt, M., & Fierro, R. (2003, Mar). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59(5-6), 1171-1180. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01175-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01175-5)
- Joensen, U. N., Bossi, R., Leffers, H., Jensen, A. A., Skakkebaek, N. E., & Jorgensen, N. (2009, Jun). Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect*, 117(6), 923-927. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800517>
- Johnson, P. I., Sutton, P., Atchley, D. S., Koustas, E., Lam, J., Sen, S., Robinson, K. A., Axelrad, D. A., & Woodruff, T. J. (2014, Oct). The Navigation Guide - evidence-based medicine meets environmental health: systematic review of human evidence for PFOA effects on fetal growth. *Environ Health Perspect*, 122(10), 1028-1039. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307893>
- Kang, J. S., Ahn, T. G., & Park, J. W. (2019, Apr 15). Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluooctane sulfonate (PFOS) induce different modes of action in reproduction to Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J Hazard Mater*, 368, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.034>
- Kang, J. S., Choi, J. S., & Park, J. W. (2016, Jul). Transcriptional changes in steroidogenesis by perfluoroalkyl acids (PFOA and PFOS) regulate the synthesis of sex hormones in H295R cells. *Chemosphere*, 155, 436-443. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.070>

- Kwon, W. S., Rahman, M. S., Lee, J. S., You, Y. A., & Pang, M. G. (2015, May). Improving litter size by boar spermatozoa: application of combined H33258/CTC staining in field trial with artificial insemination. *Andrology*, 3(3), 552-557. <https://doi.org/10.1111/andr.12020>
- Kwon, W. S., Shin, D. H., Ryu, D. Y., Khatun, A., Rahman, M. S., & Pang, M. G. (2018, Jun). Applications of capacitation status for litter size enhancement in various pig breeds. *Asian-Australas J Anim Sci*, 31(6), 842-850. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0760>
- Leahy, T., Rickard, J. P., Aitken, R. J., & de Graaf, S. P. (2016a, May). D-penicillamine prevents ram sperm agglutination by reducing the disulphide bonds of a copper-binding sperm protein. *Reproduction*, 151(5), 491-500. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0596>
- Leahy, T., Rickard, J. P., Aitken, R. J., & de Graaf, S. P. (2016b, Feb). Penicillamine prevents ram sperm agglutination in media that support capacitation. *Reproduction*, 151(2), 167-177. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0413>
- Lei, M., Zhang, L., Lei, J., Zong, L., Li, J., Wu, Z., & Wang, Z. (2015). Overview of Emerging Contaminants and Associated Human Health Effects. *Biomed Res Int*, 2015, 404796. <https://doi.org/10.1155/2015/404796>
- Letelier, M. E., Lepe, A. M., Faundez, M., Salazar, J., Marin, R., Aracena, P., & Speisky, H. (2005, Jan 15). Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem Biol Interact*, 151(2), 71-82. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.12.004>

- Leter, G., Consales, C., Eleuteri, P., Uccelli, R., Specht, I. O., Toft, G., Moccia, T., Budillon, A., Jonsson, B. A., Lindh, C. H., Giwercman, A., Pedersen, H. S., Ludwicki, J. K., Zvezdai, V., Heederik, D., Bonde, J. P., & Spano, M. (2014, Aug). Exposure to perfluoroalkyl substances and sperm DNA global methylation in Arctic and European populations. *Environ Mol Mutagen*, 55(7), 591-600. <https://doi.org/10.1002/em.21874>
- Li, K., Gao, P., Xiang, P., Zhang, X., Cui, X., & Ma, L. Q. (2017, Feb). Molecular mechanisms of PFOA-induced toxicity in animals and humans: Implications for health risks. *Environ Int*, 99, 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.014>
- 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, Jan). Perfluorochemicals and human semen quality: the LIFE study. *Environ Health Perspect*, 123(1), 57-63. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307621>
- Mattioli, M., Barboni, B., Lucidi, P., & Seren, E. (1996, Jan 15). Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 45(2), 373-381. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)81099-5](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)81099-5)
- Monclus, M. A., & Fornes, M. W. (2016, Oct). Sperm conjugation in mammal reproductive function: Different names for the same phenomenon? *Mol Reprod Dev*, 83(10), 884-896. <https://doi.org/10.1002/mrd.22636>
- 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://www.ncss.com/software/ncss/ncss-documentation/#Regression>

Netter, P., Bannwarth, B., Pere, P., & Nicolas, A. (1987). Clinical pharmacokinetics of d-penicillamine. *Clinical Pharmacokinetics*, 13, 317-333.

O'Flaherty, C., & Matsushita-Fournier, D. (2017, Oct 1). Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol Reprod*, 97(4), 577-585.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iox104>

Ortiz-Sánchez, P. B. (2017). *Efecto de los compuestos perfluorados PFHxS y PFOS en la capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides de cerdo in vitro* [info:eu-repo/semantics/masterThesis]. Universidad Autónoma Metropolitana.
<https://doi.org/http://localhost/files/h702q637s>

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, Oct 21). Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) Alters Protein Phosphorylation, Increase ROS Levels and DNA Fragmentation during In Vitro Capacitation of Boar Spermatozoa. *Animals (Basel)*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/ani10101934>

Raymer, J. H., Michael, L. C., Studabaker, W. B., Olsen, G. W., Sloan, C. S., Wilcosky, T., & Walmer, D. K. (2012, Jul). Concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) and their associations with human semen quality measurements. *Reprod Toxicol*, 33(4), 419-427.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.05.024>

Roche. (2021). DTT MERCK.
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/dttro?lang=es®ion=M>

[X](#)

- Roos, P. H., Angerer, J., Dieter, H., Wilhelm, M., Wolfle, D., & Hengstler, J. G. (2008, Jan). Perfluorinated compounds (PFC) hit the headlines : meeting report on a satellite symposium of the annual meeting of the German Society of Toxicology. *Arch Toxicol*, 82(1), 57-59. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0225-2>
- Ruiz-Díaz, S., Oseguera-López, I., De La Cuesta-Díaz, D., García-Lopez, B., Serres, C., Sanchez-Calabuig, M. J., Gutiérrez-Adan, A., & Perez-Cerezales, S. (2020, Aug 21). The Presence of D-Penicillamine during the In Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa Prolongs Hyperactive-Like Motility and Allows for Sperm Selection by Thermotaxis. *Animals (Basel)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/ani10091467>
- Sciegenka, S. J., Solst, S. R., Falls, K. C., Schoenfeld, J. D., Klinger, A. R., Ross, N. L., Rodman, S. N., Spitz, D. R., & Fath, M. A. (2017, Jul). D-penicillamine combined with inhibitors of hydroperoxide metabolism enhances lung and breast cancer cell responses to radiation and carboplatin via H₂O₂-mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 108, 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.001>
- Setchell, B. (1991). Male reproductive organs and semen. In C. P. T. (Ed.), *Reproduction in Domestic Animals* (4th ed., pp. 221-250). Academic Press. https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=bbb-ow0N7K4C&oi=fnd&pg=PP1&ots=mogryYvYT_&sig=SeYqXxi526BkcQB_hf-Fw51yrWE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Steves, A. N., Turry, A., Gill, B., Clarkson-Townsend, D., Bradner, J. M., Bachli, I., Caudle, W. M., Miller, G. W., Chan, A. W. S., & Easley, C. A. t. (2018, Aug). Per-

- and polyfluoroalkyl substances impact human spermatogenesis in a stem-cell-derived model. *Syst Biol Reprod Med*, 64(4), 225-239. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1481465>
- Tvrda, E., Peer, R., Sikka, S. C., & Agarwal, A. (2015, Jan). Iron and copper in male reproduction: a double-edged sword. *J Assist Reprod Genet*, 32(1), 3-16. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0344-7>
- United States Environmental Protection Agency, E. (2021). *Basic Information on PFAS*. EPA. <https://www.epa.gov/pfas/basic-information-pfas>
- Uribe, P., Merino, J., Bravo, A., Zambrano, F., Schulz, M., Villegas, J. V., & Sanchez, R. (2020, Jun). Antioxidant effects of penicillamine against in vitro-induced oxidative stress in human spermatozoa. *Andrologia*, 52(5), e13553. <https://doi.org/10.1111/and.13553>
- van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Helms, J. B., Brouwers, J. F., & Gadella, B. M. (2005, Aug). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod*, 11(8), 583-590. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah200>
- Visconti, P. E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J. L., Acevedo, J. J., & Darszon, A. (2011, May). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, 13(3), 395-405. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.69>
- Walshe, J. (1956). Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *American Journal of Medicine*, 21, 487-495.

- Wikström, S., Lindh, C. H., Shu, H., & Bornehag, C. G. (2019, Jun 24). Early pregnancy serum levels of perfluoroalkyl substances and risk of preeclampsia in Swedish women. *Sci Rep*, 9(1), 9179. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45483-7>
- Xu, M., Cui, Z., Zhao, L., Hu, S., Zong, W., & Liu, R. (2018, Jul). Characterizing the binding interactions of PFOA and PFOS with catalase at the molecular level. *Chemosphere*, 203, 360-367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.200>
- Xu, M., Liu, G., Li, M., Huo, M., Zong, W., & Liu, R. (2020, Jan 15). Probing the Cell Apoptosis Pathway Induced by Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonate at the Subcellular and Molecular Levels. *J Agric Food Chem*, 68(2), 633-641. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07072>
- Xu, M., Wan, J., Niu, Q., & Liu, R. (2019, Aug). PFOA and PFOS interact with superoxide dismutase and induce cytotoxicity in mouse primary hepatocytes: A combined cellular and molecular methods. *Environ Res*, 175, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.05.008>
- Yang, Y., Lv, Q. Y., Guo, L. H., Wan, B., Ren, X. M., Shi, Y. L., & Cai, Y. Q. (2017, Apr). Identification of protein tyrosine phosphatase SHP-2 as a new target of perfluoroalkyl acids in HepG2 cells. *Arch Toxicol*, 91(4), 1697-1707. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1836-2>
- Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Casas, I., & Bonet, S. (2008, Oct). Boar spermatozoa and prostaglandin F2alpha. Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F2alpha to the short-term extender over cooling time. *Anim*

Reprod Sci, 108(1-2), 180-195.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.008>

Zeng, Z., Song, B., Xiao, R., Zeng, G., Gong, J., Chen, M., Xu, P., Zhang, P., Shen, M., & Yi, H. (2019, May). Assessing the human health risks of perfluorooctane sulfonate by in vivo and in vitro studies. *Environ Int*, 126, 598-610.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.002>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00225

Matricula: 2183801534

Estudio del mecanismo de la aglutinación producida por los perfluorados PFOA y PFOS en los espermatozoides de cerdo durante la capacitación *in vitro*



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 14 del mes de mayo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
DRA. ELVIA LOPEZ PEREZ
DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ
DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN

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

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: OSCAR FELIPE MONDRAGON PAYNE

OSCAR FELIPE MONDRAGON PAYNE
ALUMNO

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

APROBAR

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

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

DRA. ELVIA LOPEZ PEREZ

VOCAL

DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ

SECRETARIO

DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN

El presente documento cuenta con la firma –auténtica, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella