



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EFFECTO IN VITRO DEL BISFENOL-A
SOBRE LA ACTIVIDAD
MITOCONDRIAL EN
ESPERMATOZOIDES DE PORCINO**

**IN VITRO EFFECT OF BISPHENOL-A ON
MITOCHONDRIAL ACTIVITY IN BOAR
SPERMATOOZOA**

Autor: Jennifer Rodríguez Zapata

GRADO EN BIOLOGÍA

Diciembre, 2020

FIRMA DEL ALUMNO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jennifer', with a large, sweeping underline that extends across the width of the name.

Fdo.: Jennifer Rodríguez Zapata

En León, a 8 de diciembre de 2020



AUTORIZACIÓN DEL TUTOR PARA LA PRESENTACIÓN

DATOS DE LA ESTUDIANTE

Apellidos RODRÍGUEZ ZAPATA	Nombre JENNIFER
DNI/Pasaporte 12423897X	Dirección Postal P/ARCO LADRILLO, 72, 3ºC
C.Postal 47007	Localidad VALLADOLID Provincia VALLADOLID
Teléfono 692363594	E-mail JRODRZ00@ESTUDIANTES.UNILEON.ES
Grado en BIOLOGÍA	Curso Académico 2020/2021

TÍTULO DEL TRABAJO

EFFECTO IN VITRO DEL BISFENOL A SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN
ESPERMATOZOIDES DE PORCINO

DATOS DEL TUTOR/ES

D. FELIPE MARTINEZ PASTOR DNI 12776847W
Departamento/Área BIOLOGIA MOLECULAR/ BIOLOGÍA CELULAR
Instituto de investigación INDEGSAL

AUTORIZA a Dña. Jennifer Rodríguez Zapata
a presentar su TRABAJO FIN DE GRADO.

León, a 16 de noviembre de 2020

EL TUTOR

Fdo.: D. FELIPE MARTINEZ PASTOR

VºBº EL TUTOR ACADÉMICO (SOLO en caso de que haya un Tutor externo)

Fdo.: D./Dña. _____

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Bisfenol A y sus aplicaciones.....	1
1.2. Exposición y metabolismo del BPA.....	2
1.3. Legislación y dosis máxima de BPA.....	2
1.4. Posibles efectos del BPA en la salud.....	3
1.5. Posibles efectos del BPA en la salud reproductiva.....	4
1.6. Efecto del BPA en los espermatozoides.....	4
2. Objetivos del trabajo.....	5
3. Material y métodos.....	6
3.1. Diseño experimental.....	6
3.1.1. Puesta a punto de la técnica en el lector de microplacas.....	6
3.1.2. Exposición de los espermatozoides al BPA.....	8
3.1.3. Citometría de flujo.....	9
3.1.4. Análisis estadístico.....	9
3.2. Reactivos y medios.....	10
3.2.1. Ioduro de propidio.....	10
3.2.2. JC-1.....	10
3.2.3. MitoTracker Red CMXRos.....	11
3.2.4. MitoTracker Orange CMTMRos.....	11
3.2.5. Bisfenol A (BPA).....	11
3.3. Muestras de semen.....	12
3.4. Determinación de la concentración de espermatozoides.....	12
3.5. Experimento con ioduro de propidio (PI).....	13
3.6. Determinación de la actividad mitocondrial con fluorocromos.....	14
3.6.1. Prueba con espermatozoides refrigerados.....	16
3.7. Exposición de los espermatozoides al BPA.....	17

4. Resultados	18
4.1. Resultados del experimento con yoduro de propidio (PI).....	19
4.2. Resultados del experimento de determinación de la actividad mitocondrial con fluorocromos.....	19
4.3. Resultados para la prueba con espermatozoides refrigerados.....	20
4.4. Resultados para el experimento de exposición de los espermatozoides al BPA.....	21
4.5. Resultados de la citometría de flujo.....	22
4.5.1. <i>Resultados de viabilidad</i>	23
4.5.2. <i>Resultados de apoptosis</i>	23
4.5.3. <i>Resultados de actividad mitocondrial</i>	24
5. Discusión	25
6. Referencias	28

RESUMEN

El consumo y la fabricación de alimentos envasados han aumentado considerablemente en los últimos años, provocando que nos encontremos cada vez más expuestos a ciertos xenobióticos presentes en el plástico. Este es el caso del bisfenol A (BPA), una sustancia que parece tener efectos nocivos en los seres humanos, sobretodo en su salud reproductiva. Con el fin de observar los efectos del BPA en la actividad mitocondrial espermática, se llevaron a cabo experimentos de exposición de espermatozoides de cerdo a esta sustancia utilizando distintas concentraciones: 5, 16, 50, 158 y 500 μM , tomando medidas cada 30 minutos durante 2 horas con un lector de microplacas. Comparativamente se realizó el mismo experimento usando citometría de flujo. Además, se realizaron experimentos previos para llevar a cabo una puesta a punto de la técnica para el lector de microplacas, concluyendo que el JC-1 resultaba el fluorocromo más adecuado para las pruebas, aunque no se obtuvieron resultados concluyentes. Los resultados del experimento con citometría mostraron una disminución de la actividad mitocondrial de los espermatozoides y una reducción en el número de células viables a las 2 horas de incubación ($p < 0,001$). En cuanto a las dosis, únicamente se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) para la dosis de 500 μM de BPA. Concluimos que el BPA podría afectar a los espermatozoides interfiriendo con su actividad mitocondrial, aunque a dosis relativamente altas.

Palabras clave: Bisfenol A; Actividad mitocondrial; Espermatozoides; Fluorocromo; Citometría de flujo

ABSTRACT

The consumption and manufacture of packaged foods have increased considerably in recent years, causing us to find ourselves increasingly exposed to certain xenobiotics present in plastic. This is the case of bisphenol A (BPA), a substance that seems to have harmful effects on humans, especially on their reproductive health. In order to observe the effects of BPA on sperm mitochondrial activity, boar spermatozoa were exposed to this substance using different concentrations: 5, 16, 50, 158 and 500 μM , taking measurements every 30 minutes for 2 hours with a microplate reader. Comparatively the same experiment was performed using flow cytometry. In addition, previous experiments were carried out to fine-tune the technique for the microplate reader, concluding that JC-1 was the most suitable fluorochrome for the tests, although no conclusive results were obtained. The results of the experiment with flow cytometry showed a decrease in the mitochondrial activity of the spermatozoa and a reduction in the number of viable cells at 2 hours of incubation ($p < 0.001$). Regarding the doses, significant differences ($p < 0.001$) were only observed for the 500 μM dose of BPA. We conclude that BPA could affect sperm by interfering with their mitochondrial activity, albeit at relatively high doses.

Key words: Bisphenol A; Mitochondrial activity; Spermatozoa; Fluorochrome; Flow cytometry

1. Introducción

1.1. Bisfenol A y sus aplicaciones

Actualmente existe una creciente exposición a multitud de xenobióticos que ya forman parte de nuestra rutina diaria. Tal es el caso del bisfenol A (BPA) o [4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano], un producto utilizado en la industria química para la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi desde los años 50 (Mileva *et al.*, 2014). Su uso se encuentra muy extendido, apareciendo en latas, platos, envases de alimentos, botellas de plástico, CDs e incluso se ha encontrado en los biberones (aunque su uso para este fin se prohibió en 2011). Sus niveles de producción mundial presentan cifras elevadas, registrándose en 2006 una producción de 3,8 millones de toneladas (Fitzgerald *et al.*, 2014), y en la actualidad su producción anual se estima en más de 6 millones de toneladas (Vandenberg *et al.*, 2009). Además, cada año, debido a los procesos de síntesis, se liberan a la atmósfera más de 100 toneladas de BPA, suponiendo también un contaminante ambiental importante (Fitzgerald *et al.*, 2014).

Se trata de una molécula orgánica sintetizada por primera vez por el químico ruso Alexander Dianin en 1831, pero no fue hasta principios de 1930 cuando se conocieron más a fondo sus propiedades estrogénicas. Esta sustancia es preparada mediante la condensación de una molécula de acetona con dos moléculas de fenol en presencia de ácido clorhídrico (Vandenberg *et al.*, 2009).

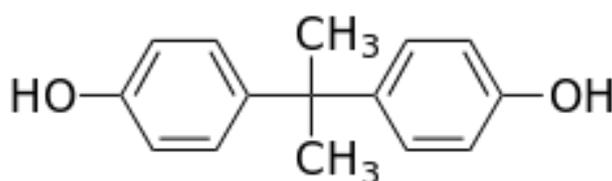


Figura 1. Estructura química del BPA (Krishnan *et al.*, 1993).

El BPA se encuentra dentro del grupo de los compuestos disruptores endocrinos (CDE), definidos como “sustancias exógenas al organismo que se encuentran en el medio ambiente, en los alimentos y en los productos destinados a los consumidores, que interfieren con la biosíntesis de hormonas, el metabolismo y en las acciones resultantes de estas, provocando una alteración en la homeostasia normal del individuo expuesto o en la de sus descendientes” (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

El BPA es capaz, por tanto, de interactuar con los receptores de estrógenos humano (ER), uniéndose a los receptores nucleares, citoplasmáticos y de membrana de las células (Krishnan *et al.*, 1993). También se ha descrito su actividad como antagonista del receptor de andrógenos humano (AR) (Xu *et al.*, 2005). Por ello, durante los años 30, fue investigado para ser usado como estrógeno sintético. Sin embargo, la idea se desechó al comprobar que el dietilestilbestrol (DES) era un estrógeno mucho más potente que el BPA (Dodds y Lawson, 1936).

1.2. Exposición y metabolismo del BPA

El BPA presenta tres vías de entrada al organismo: oral, cutánea o inhalatoria. La exposición a esta sustancia suele producirse mayormente por el consumo de comida enlatada. Sin embargo, a día de hoy existe una exposición constante al BPA debido a su presencia en el medio ambiente (Flint *et al.*, 2012). Su mecanismo de acción depende de la dosis y de la etapa vital de exposición, produciendo mayores efectos durante el periodo prenatal y neonatal (Vandenberg *et al.*, 2009). Por vía oral, el BPA es metabolizado rápidamente en el hígado (Völkel *et al.*, 2002) y eliminado con la orina, en un proceso de desintoxicación bastante eficiente (Matthews *et al.*, 2001).

Por tanto, el BPA libre disponible resulta muy limitado, pero podría unirse a los receptores de estrógenos, provocando alteraciones hormonales (Mileva *et al.*, 2014).

1.3. Legislación y dosis máxima de BPA

El uso tan extendido del bisfenol A en la actualidad hace que su regulación resulte muy necesaria. En la Unión Europea el uso del BPA como material para entrar en contacto con los alimentos se encuentra regulado y autorizado según el Reglamento 10/2011, de 14 de enero. No obstante, su uso para la fabricación de biberones de plástico fue terminantemente prohibido en 2011, según el Reglamento 321/2011.

Muchos son los organismos competentes que han realizado diversos estudios y publicaciones sobre los posibles efectos adversos del BPA. Entre ellos, destaca la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y por supuesto, la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA). Sin embargo, los informes de estas

instituciones han contemplado únicamente la fuente de exposición dietética durante mucho tiempo, dictaminando que el BPA no resultaba peligroso para la salud (Juan-García *et al.*, 2015). En 2015, tras una evaluación mucho más exhaustiva, la EFSA concluyó que el BPA no supone un peligro para la salud siempre y cuando se respeten los límites fijados por los organismos competentes.

Con el fin de garantizar que el material en contacto con los alimentos no conlleva ningún riesgo para la salud, la Comisión Europea expone en el Reglamento 10/2011 la cantidad máxima permitida de BPA en los alimentos, situando el límite genérico en 60 mg de sustancia/kg de alimento. En cuanto al valor de ingesta diaria tolerable (IDT), este fue fijado por la EFSA en 2015 en 4 µg/kg de peso corporal al día, aunque este valor queda a la espera del análisis de resultados de nuevos estudios que se están realizando en la actualidad por el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos.

1.4. Posibles efectos del BPA en la salud

Existen gran cantidad estudios clínicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, que han asociado el desarrollo de variedad de efectos adversos para la salud con la exposición al BPA, entre estos efectos se encuentran las enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, problemas reproductivos, cáncer (de próstata y de mama) e incluso se ha llegado a observar comportamientos depresivos en ratas y ratones (Fujimoto *et al.*, 2006). Sin embargo, aunque parece que existe una relación entre el BPA y estas enfermedades, el mecanismo por el cual el BPA induce estas afecciones permanece desconocido, creyéndose que puede estar relacionado con procesos epigenéticos (Mileva *et al.*, 2014).

En cuanto al cáncer, enfermedad con elevada incidencia mundial, se ha observado que el BPA promueve que ciertos genes, proteínas o determinados factores relacionados con el crecimiento celular se sobreexpresen o se inhiban por completo, pudiendo provocar el desarrollo de tumores y de cáncer (Ma *et al.*, 2015). También se ha visto que concentraciones bajas de BPA son capaces de promover la expresión del gen HOXC6, utilizado como indicador de diversos tipos de cáncer de mama (Hussain *et al.*, 2015).

De todas maneras, resulta imposible establecer con total seguridad que el BPA sea el único causante de ninguna enfermedad, aunque se está estudiando la posibilidad de que

la exposición a ciertas dosis pudiera contribuir, al igual que otras muchas causas (ambientales, genéticas, etc.), al desarrollo de la misma.

1.5. Posibles efectos del BPA en la salud reproductiva

Como disruptor endocrino, el BPA es capaz de modular o provocar ciertos cambios en el balance hormonal de un organismo, afectando así a los procesos reproductivos tanto masculinos como femeninos.

En el tracto reproductivo femenino, el BPA ha sido relacionado con anomalías en la morfología uterina y con la endometriosis, existiendo estudios que demuestran una incidencia muy superior de esta afección en ratas tratadas con BPA durante su embarazo en comparación con las ratas control (Signorile *et al.*, 2010).

La exposición de las células placentarias al BPA podría causar complicaciones en el embarazo, tales como preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino, prematuridad y, en última instancia, aborto (Benachour y Aris, 2009).

En cuanto a los posibles efectos producidos en la salud masculina, el BPA se ha asociado con el descenso de la producción diaria de espermatozoides y el aumento en el tamaño de la próstata (Vom Saal *et al.*, 1998), aunque también se han identificado malformaciones en la uretra, cuya conexión con la vejiga se encontraba significativamente estreñida en estudios realizados con ratones (Timms *et al.*, 2005).

1.6. Efecto del BPA en los espermatozoides

La exposición a ciertas dosis de BPA provoca un impacto en la actividad mitocondrial de los espermatozoides, causando así una reducción de la motilidad de los mismos. En condiciones óptimas, la energía producida por la mitocondria proporciona el ATP necesario para el movimiento espermático. Esta energía es generada en el paso de los electrones por la cadena transportadora de electrones, y permite la salida de protones (H^+) en contra de gradiente hacia el espacio intermembrana, generando así un potencial de membrana negativo en la matriz mitocondrial. En el caso de que exista una disfuncionalidad mitocondrial causada por el BPA, esta podría dar lugar a diferentes

afecciones, como por ejemplo una disminución de la movilidad de los espermatozoides (Silveira, 2016).

También se han observado efectos adversos en los espermatozoides como consecuencia del estrés oxidativo (Rahman *et al.*, 2019). Este estrés oxidativo es resultado de elevados niveles de ROS (especies reactivas del oxígeno) y se ve aumentado por las modificaciones de las proteínas dependientes de procesos redox. La exposición de los espermatozoides al BPA provoca un aumento de este proceso, y esto podría ser asociado con ciertos efectos negativos producidos en la fertilidad (Rahman *et al.*, 2018).

Estos efectos producidos por el BPA en los espermatozoides pueden ser estudiados mediante el uso de fluorocromos, colorantes capaces de penetrar y teñir ciertos compartimentos de la mitocondria. Esta tinción permite poder diferenciar entre células activas e inactivas, existiendo incluso fluorocromos capaces de discriminar células en función de su potencial de membrana.

Para teñir las mitocondrias, simplemente se incuban los espermatozoides en concentraciones submicromolares de la sonda fluorescente, que se difunde pasivamente y se acumula en las mitocondrias activas, siempre que exista un potencial de membrana negativo de 100-200 mV (Hallap *et al.*, 2005).

A pesar de existir distintos métodos para el análisis de los espermatozoides marcados con fluorocromos, la citometría de flujo es la técnica usada con mayor frecuencia debido a su capacidad de realizar medidas individuales sobre cada célula, además de ser una técnica objetiva, altamente sensible y con gran velocidad de análisis.

2. Objetivos del trabajo

En los últimos 50 años, la función reproductiva masculina se ha visto significativamente deteriorada, y dicha alteración podría estar relacionada con la exposición a distintos contaminantes con los que convivimos diariamente, como es el caso del BPA.

Pese a la limitada literatura existente acerca de este tema, ciertos estudios evidencian la relación entre el BPA y distintos efectos adversos identificados en los espermatozoides. Este trabajo tiene por objetivo estudiar el impacto provocado por el BPA en los espermatozoides de cerdo como modelo de citotoxicidad, basándose para ello en la

observación de cambios en la actividad mitocondrial de las células incubadas con esta sustancia a distintas concentraciones. También se utilizarán distintos tiempos de exposición con el fin de comprobar la relación entre estos y el daño celular.

Para la consecución de este objetivo, en primer lugar se realizaron varios experimentos para la puesta a punto de la técnica (decidir la concentración de los fluorocromos, el colorante más adecuado, etc.) utilizando el lector de microplacas BioTek Synergy. Comparativamente se realizó el mismo experimento utilizando citometría de flujo.

3. Material y métodos

3.1. Diseño experimental

Con el fin de estudiar la toxicidad del bisfenol A en los espermatozoides se dividió el trabajo de laboratorio en dos partes. En la primera, se llevaron a cabo tres experimentos distintos que tenían por objetivo la puesta a punto de la técnica con el lector de microplacas. Estos experimentos no dieron resultados concluyentes, por lo que en la segunda parte se repitieron los experimentos exponiendo los espermatozoides al BPA y utilizando citometría de flujo para el análisis de las muestras.

3.1.1. Puesta a punto de la técnica en el lector de microplacas

Experimento con ioduro de propidio (PI)

Este primer experimento tenía por objetivo relacionar la fluorescencia emitida por los espermatozoides con la actividad mitocondrial de los mismos. Se entiende que la relación existente entre la fluorescencia y la actividad mitocondrial es directamente proporcional, de tal manera que cuanto mayor sea la fluorescencia detectada por el lector de placas, mayor será también la actividad mitocondrial de la célula.

Para ello se utilizaron tres tratamientos distintos: los espermatozoides sin teñir, utilizados como control de autofluorescencia, los espermatozoides teñidos con PI, utilizados para comprobar la concentración de células muertas en la muestra, y los espermatozoides muertos por congelación y teñidos con PI, utilizados como control

positivo. Estos últimos se consiguieron congelando los espermatozoides con nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelándolos en un baño de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ repetidas veces.

Además, también se buscó estudiar si existían diferencias en la fluorescencia obtenida variando la concentración espermática, utilizando para ello factores de dilución constantes para obtener una progresión geométrica de la concentración, en forma semilogarítmica. Se realizaron así 7 diluciones de la muestra inicial de espermatozoides (10^0 , $10^{0.5}$, 10^1 , $10^{1.5}$, 10^2 , $10^{2.5}$, 10^3).

Experimento con fluorocromos para evaluar la función mitocondrial

Este experimento se realizó con el fin de volver a probar las concentraciones espermáticas elegidas y para medir una vez más la actividad mitocondrial a partir de la fluorescencia. En este caso se pretendía probar tres fluorocromos (MitoTracker Orange CMTMRos, MitoTracker Red CMXRos y JC-1) para determinar cuál de ellos resultaba adecuado para el experimento de exposición al bisfenol A.

Se usaron también inhibidores específicos de cada tinción para comprobar así cuál de ellas producía un menor fondo, ya que los inhibidores bloquean la cadena de transporte de electrones y disipan el gradiente de la mitocondria. Así, la actividad mitocondrial de la célula se ve prácticamente inhibida, permitiendo analizar cuánto colorante se fija sin la existencia de un potencial de membrana negativo.

El fondo producido por los fluorocromos se puede entender como señales desconocidas que pueden confundirse con el fenómeno a medir, en este caso la fluorescencia (Hulspas *et al.*, 2009). También puede ocurrir que las células presenten de manera natural cierta autofluorescencia debida al tipo celular y a sus condiciones fisiológicas (Monici, 2005). En el caso de que la fluorescencia emitida por las muestras con inhibidor fuese superior a la de aquellas muestras que no lo llevan, quedaría patente que estas tinciones producen demasiado fondo y son menos apropiadas para la realización del experimento.

Para este experimento se realizaron las mismas diluciones espermáticas que en el caso anterior (10^0 , $10^{0.5}$, 10^1 , $10^{1.5}$, 10^2 , $10^{2.5}$, 10^3). También resultó necesario diluir los fluorocromos.

Prueba con espermatozoides refrigerados

Al no obtener resultados del todo satisfactorios con los espermatozoides congelados en nitrógeno a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, se realizó una prueba con espermatozoides refrigerados a $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el fin de descartar que estos resultados se debieran a la muerte celular provocada por la descongelación o al diluyente utilizado. Los espermatozoides refrigerados de porcino tienen una duración limitada, de unos días, en comparación con los congelados, que se pueden preservar durante años.

En este experimento también se probaron distintas concentraciones de los fluorocromos para observar a qué concentración del mismo se obtenían mejores resultados. Para ello se utilizaron los tres colorantes habituales (MitoTracker Red CMXRos, MitoTracker Orange CMTMRos y JC-1) a distintas concentraciones ($2\text{ }\mu\text{M}$, $1\text{ }\mu\text{M}$ y 200 nM).

En esta prueba no se utilizaron diluciones de los espermatozoides, sino que se usaron a la concentración fija de $25\cdot 10^6/\text{ml}$.

3.1.2. Exposición de los espermatozoides al BPA

Este es el experimento principal de este trabajo, teniendo como objetivo el análisis de los efectos provocados por el BPA en la actividad mitocondrial de los espermatozoides.

Para decidir las concentraciones de BPA a las que habría que exponer a los espermatozoides se consultaron estudios similares (Barbonetti *et al.*, 2016; Hulak *et al.*, 2013). Se decidió así que se utilizarían concentraciones de BPA de 100 mM , 32 mM , 10 mM , $3,2\text{ mM}$ y 1 mM .

Se utilizó una concentración fija de espermatozoides a $10\cdot 10^6/\text{ml}$. Aunque se hayan realizado los experimentos anteriores con $25\cdot 10^6/\text{ml}$, se observó que la fluorescencia era suficiente a $10\cdot 10^6/\text{ml}$ y por tanto para este experimento se bajó a esa concentración.

Como colorante se utilizó el que mejores resultados obtuvo en los experimentos anteriores, el JC-1, a una concentración ya probada de 100 nM . Como control positivo se utilizó un tubo que contenía espermatozoides muertos por congelación-descongelación.

Con el fin de estudiar también la relación entre el tiempo de exposición al BPA y la degradación celular se utilizaron cinco tiempos de exposición de los espermatozoides al mismo (T.0, T.1, T.2, T.3 y T.4), realizando lecturas con el lector de placas cada media hora durante dos horas.

3.1.3. Citometría de flujo

Se utilizó citometría de flujo para analizar la viabilidad y actividad mitocondrial de las células, ya que esta técnica permite obtener resultados muy precisos, al presentar alta sensibilidad y objetividad.

Se realizó el mismo experimento que en el caso anterior, utilizando una concentración fija de espermatozoides a $10 \cdot 10^6$ /ml y usando concentraciones de BPA de 100 mM, 32 mM, 10 mM, 3,2 mM y 1 mM. Como colorante se utilizó el JC-1 y como control positivo se utilizó un tubo con espermatozoides muertos por congelación-descongelación. También se realizaron medidas cada media hora durante dos horas.

Las muestras se analizaron utilizando un citómetro CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), provisto de tres láseres de diodo: 405 nm (violeta), 488 nm (azul) y 635 nm (rojo). La fluorescencia fue recogida por fotodetectores provistos de filtros 530/40 (láser azul, fluorescencia verde: YO-PRO-1), 613/20 (láser azul, fluorescencia roja: yoduro de propidio) y 665/20 (láser rojo, fluorescencia roja: MitoTracker).

3.1.4. Análisis estadístico

A causa del cese de actividad en el laboratorio provocado por la crisis sanitaria del COVID-19, resultó imposible realizar réplicas suficientes de los experimentos llevados a cabo en las microplacas, por lo que se presentan los resultados sin ninguna estadística.

Para el análisis estadístico de los resultados de citometría se utilizó una estadística con modelos lineales de efectos mixtos, agregando como factores fijos la dosis y el tiempo de incubación y como factor aleatorio el macho.

Se utilizó un test ANOVA para el análisis de los resultados, agregando el tiempo como variable continua.

3.2. Reactivos y medios

3.2.1. Ioduro de propidio

El ioduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich[®], San Luis, Misuri, EE. UU.) Es una tinción nuclear y cromosómica fluorescente. El PI usado, al igual que el resto de tinciones que se mencionarán, pertenece a la casa comercial ThermoFisher. El stock utilizado fue de 1,5 mM, conservado en agua ultrapura y a -20 °C.

Este fluorocromo no penetra en el interior de las células vivas, por lo que es comúnmente utilizado para detectar células muertas o deterioradas en una población. Una vez que la tinción se une al DNA al atravesar la membrana de las células muertas, su fluorescencia aumenta de 20 a 30 veces, lo que resulta en una emisión máxima de fluorescencia a 617 nm (Love *et al.*, 2003).

3.2.2. JC-1

La tinción JC-1 (Sigma Aldrich[®], San Luis, Misuri, EE. UU.) Es ampliamente usada en estudios de apoptosis para evaluar la actividad mitocondrial. Puede ser utilizado como un indicador del potencial de membrana mitocondrial en una gran variedad de tipos celulares, así como en tejidos intactos y mitocondrias aisladas.

Esta tinción facilita la discriminación de las mitocondrias activas e inactivas, ya que el colorante, normalmente verde fluorescente cuando la membrana se encuentra despolarizada, forma agregados naranjas cuando se concentra en mitocondrias que presentan un potencial de membrana alto (Martínez-Pastor *et al.*, 2004). La proporción de fluorescencia naranja:verde depende del potencial de membrana de la mitocondria, lo que le confiere al JC-1 la característica única de discernir entre distintos potenciales de membrana (Cossarizza *et al.*, 1996).

La concentración del stock de JC-1 utilizada fue de 1,5 mM. Se encontraba conservado en DMSO y a -20 °C.

3.2.3. MitoTracker Red CMXRos

El MitoTracker Red CMXRos (Sigma Aldrich[®], San Luis, Misuri, EE. UU.) Es un colorante rojo fluorescente específico para la tinción de mitocondrias de las células vivas (Garner *et al.*, 1997). Estos colorantes contienen fracciones de clorometil que se cree que reaccionan con los grupos tiol libres dentro de la célula (Buckman *et al.*, 2001). Este colorante queda retenido en la mitocondria después de la fijación debido al complejo impermeable de membrana que se crea cuando el fluorocromo entra en la mitocondria (Buckman *et al.*, 2001).

La concentración del stock de MitoTracker Red CMXRos utilizada fue de 1 mM. Se encontraba conservado en DMSO y a -20 °C.

3.2.4. MitoTracker Orange CMTMRos

El MitoTracker Orange CMTMRos (Sigma Aldrich[®], San Luis, Misuri, EE. UU.) es un colorante similar al anterior, se trata de un naranja fluorescente que únicamente se une a las mitocondrias de las células vivas intactas (Mronga *et al.*, 2004). Su acumulación en la mitocondria depende del potencial de la membrana.

La concentración del stock de MitoTracker Orange CMTMRos utilizada fue de 100 µM. Se encontraba conservado en DMSO y a -20 °C.

3.2.5. Bisfenol A (BPA)

El bisfenol A, ya mencionado, se trata de uno de los contaminantes ambientales que se libera en mayor cantidad al medio y es muy utilizado en la fabricación de plásticos (Chitra *et al.*, 2003). El BPA utilizado para la realización de este trabajo fue cedido por la Dra. María Paz Herráez y por la Dra. Marta Lombó, investigadoras pertenecientes al Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de León.

3.3. Muestras de semen

En el estudio se utilizaron muestras de semen de cerdo (*Sus scrofa*), procedentes del instituto INDEGSAL (Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal), perteneciente a la Universidad de León.

Estas muestras se encontraban contenidas en pajuelas de 0,25 mL, identificadas con un código que permite conocer la fecha y procedencia concreta de cada dosis seminal. En este caso, se utilizaron pajuelas que tenían grabado el código 20 Jun 05 R0386 LD. Este código se corresponde con la fecha, el código del macho y la raza (Landrace). Se utilizó únicamente un macho para la puesta a punto de la técnica de placas, ya que se trataba de un macho de buena calidad.

Las pajuelas se encuentran congeladas en un tanque de nitrógeno líquido (-196 °C) para su conservación, por lo que es imprescindible llevar a cabo un protocolo de descongelación adecuado para que este proceso se realice sin provocar daño celular. Para ello, se siguió un protocolo estándar que consistía en extraer las pajuelas del tanque de nitrógeno con unas pinzas y posteriormente proceder a su inmersión en un baño de agua a 37 °C durante 30 segundos. A continuación, se retiraron las pajuelas del baño y se eliminó el agua secándolas con papel de filtro. Se cortó la parte sellada de la pajuela (por debajo del tapón de algodón) y se depositó su contenido en un tubo de 1,5 mL.

Para este estudio utilizamos un total de 7 pajuelas, usando una para cada experimento realizado (dos de ellas se utilizaron para los experimentos de exposición al bisfenol A).

3.4. Determinación de la concentración de espermatozoides

Para poder llevar a cabo este estudio fue necesario determinar, en primer lugar, la concentración de espermatozoides que resultaba adecuada para obtener un resultado óptimo de fluorescencia mediante el uso del Lector Multi-Modal Synergy HTX (BioTek® Instruments, Inc., Vermont, EE. UU.). Este lector es capaz de medir absorbancia, luminiscencia y fluorescencia, pero para este trabajo se utilizaron únicamente medidas de fluorescencia. El Synergy HTX es controlado por el Software de análisis de datos Gen5 que permite analizar y exportar los resultados obtenidos tras la lectura.

Primero se determinó la concentración espermática de la muestra inicial, usando para ello un microscopio Nikon Eclipse E400, la cámara de recuento Makler y el software ISAS (Integrated Semen Analysis System) versión 1.19 (Proiser, Valencia, España). Se observaron varios campos distintos y se estimó el valor medio de espermatozoides de la muestra en 1000 millones/ml.

La concentración adecuada de espermatozoides se consideró de $25 \cdot 10^6$ /ml, basándose en otros estudios similares (Pérez Gómez, 2019).

Para obtener una concentración de $25 \cdot 10^6$ /ml de espermatozoides se realizó el siguiente cálculo: $\frac{25 \text{ M/ml}}{1000 \text{ M/ml}} \times 1 \text{ ml} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}}$, siendo el resultado de este cálculo el volumen de espermatozoides a añadir. De esta manera, para una concentración de $25 \cdot 10^6$ /ml de espermatozoides fue necesario añadir 25 μl de la muestra en 1 ml de BTS. Una vez realizada la dilución principal, comprobó que la concentración fuera la buscada realizando el conteo oportuno con la cámara Markle.

3.5. Experimento con ioduro de propidio (PI)

Para el experimento con PI fue necesario calcular los μl de muestra que había que añadir al BTS para obtener las diluciones propuestas (10^0 , $10^{0,5}$, 10^1 , $10^{1,5}$, 10^2 , $10^{2,5}$, 10^3). Así, se dividió el volumen final de 0,5 ml entre la dilución correspondiente. Las diluciones de los espermatozoides se realizaron siguiendo las medidas de la tabla 1.

Tabla 1. Composición de las soluciones (en μl) llevadas a cabo para este experimento. Se usaron las mismas cantidades para los tres tratamientos.

Log	μl espermatozoides	μl BTS (o PI)
0	500	0
0,5	156,5	343,5
1	50	450
1,5	15,5	484,5
2	5	495
2,5	1,6	498,4
3	0,5	499,5

Se obtuvieron 7 tubos con los espermatozoides a la dilución correspondiente + BTS, 7 con espermatozoides + ioduro de propidio (PI) y 7 de espermatozoides muertos por congelación-descongelación, diluidos también en BTS (un tubo por cada dilución y tratamiento). En total se obtuvieron 21 tubos.

Se utilizó una microplaca negra opaca de 96 pocillos, ya que estas resultan apropiadas para realizar ensayos de fluorescencia con lectores de placas que leen en la parte superior. Se usaron 3 columnas, rellenándose cada pocillo con 200 μ l de cada tubo de la manera expuesta en la figura 2. Se añadieron también dos blancos (solución correspondiente sin espermatozoides). Después se colocó la placa en el lector y se activó un protocolo de agitación e incubación a 37 °C antes de proceder a la lectura.

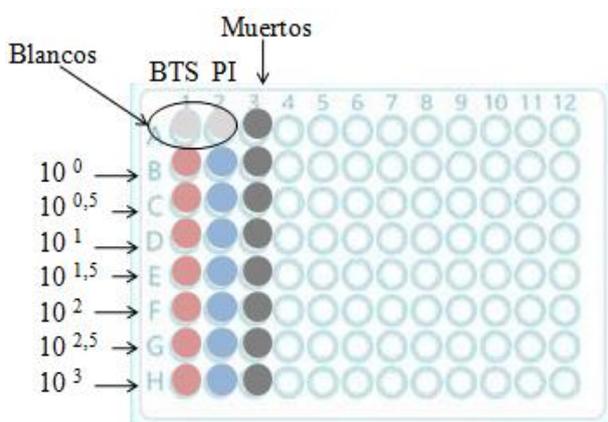


Figura 2. Representación del proceso experimental seguido para el rellenado de la microplaca utilizando los tubos que contenían cada uno de los tres tratamientos aplicados (el color rosa representa el de BTS, el azul el de PI y el negro el de espermatozoides muertos). En cada pocillo se agregaron 200 μ l procedentes de cada tubo. Se muestran también los blancos en la parte superior (contenían únicamente 200 μ l de BTS o PI) y las diluciones en la parte izquierda.

3.6. Determinación de la actividad mitocondrial con fluorocromos

Para esta prueba se llevaron a cabo los mismos pasos que en el caso anterior para obtener una muestra de $25 \cdot 10^6$ /ml de espermatozoides (a partir de una muestra inicial de $1000 \cdot 10^6$ /ml). Se realizaron diluciones con el mismo factor de dilución, difiriendo únicamente en que en este caso se requería un volumen final de 1 ml por cada tubo, a diferencia de los 0,5 ml necesarios para el experimento anterior. Estas diluciones (tabla 2) se realizaron sobre una placa a 37 °C para garantizar la máxima estabilidad para los espermatozoides.

Tabla 2. Composición de las soluciones (en μl) llevadas a cabo para este experimento de determinación de la actividad mitocondrial. Se usaron las mismas cantidades para los seis fluorocromos (3 soluciones con MitoTracker y 3 soluciones con inhibidor).

Log	μl espermatozoides	μl BTS
0	1000	0
0,5	313	687
1	100	900
1,5	32	968
2	10	990
2,5	3,2	996,8
3	1	999

Para realizar las soluciones que incorporan los MitoTracker fue necesario diluirlos para obtener una concentración final de 100 nM. En el caso del JC-1, este se encontraba a una concentración de stock de 1,5 mM y, por tanto, tuvo que ser diluido 15000 veces. Para ello se tomó 1 μl del JC-1 a 1,5 mM y se mezcló con 150 μl de BTS. A continuación, se tomó otro μl de la nueva solución y se mezcló con 100 μl de BTS, obteniéndose la dilución buscada.

El MitoTracker Red CMXRos presentaba una concentración de stock de 1 mM por lo que se diluyó 10000 veces siguiendo el protocolo ya aplicado para el JC-1. Para el MitoTracker Orange CMTMRos se realizó una dilución 1:1000 para obtener la concentración de 100 nM deseada, ya que el stock se encontraba a 100 μM .

En cuanto a las soluciones con inhibidor, simplemente se realizaron las diluciones del colorante correspondiente de manera normal y a continuación se agregó el inhibidor específico para ese colorante.

Para el análisis de las muestras se llenaron 7 tubos correspondientes a cada dilución espermática por cada uno de los 6 fluorocromos usados (MitoTracker Orange, MitoTracker Red, JC-1, inhibidor del MT. Orange, inhibidor del MT. Red e inhibidor del JC-1), obteniéndose un total de 42 tubos.

El rellenado de la placa fue similar al del caso anterior. Se usaron seis columnas, incorporando un blanco en la fila A que contenía únicamente 200 μl del colorante pertinente. El resto de pocillos se rellenaron como se indica en la figura 3, agregando

100 μ l de muestra y 100 μ l de colorante por pocillo. Se incubó la placa a 37 °C durante 20 minutos. Por último, se colocó la placa en el lector y se activó un protocolo de agitación antes de proceder a la lectura.

Este experimento se realizó dos veces más de manera similar (eliminando las tinciones que contenían los inhibidores para facilitar el proceso).

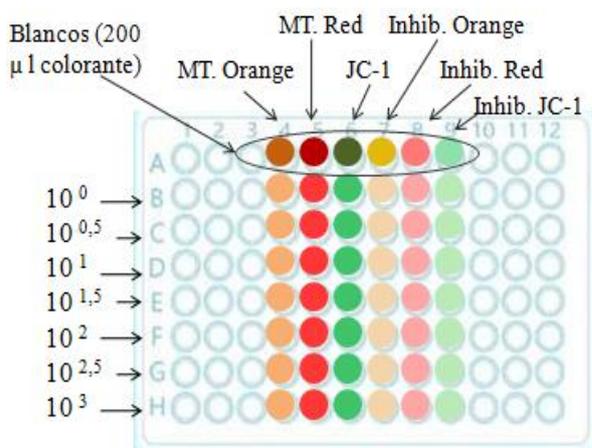


Figura 3. Representación del proceso experimental seguido para el llenado de la microplaca utilizando los tubos que contenían cada uno de los seis fluorocromos usados (en la columna 4 el MT. Orange, en la 5 el MT. Red, en la 6 el JC-1, en la 7 el inhibidor del MT. Orange, en la 8 el inhibidor del MT. Red y en la 9 el inhibidor del JC-1). En cada pocillo se agregaron 100 μ l de muestra + 100 μ l de colorante. Se muestran también los blancos en la parte superior (contenían únicamente 200 μ l del colorante en cuestión) y las diluciones utilizadas en la parte izquierda (10^0 , $10^{0,5}$, 10^1 , $10^{1,5}$, 10^2 , $10^{2,5}$, 10^3).

3.6.1. Prueba con espermatozoides refrigerados

En esta ocasión se partió de una concentración espermática de $40 \cdot 10^6$ /ml (muestra procedente del centro de sementales), y también se diluyó con BTS a $25 \cdot 10^6$ /ml.

Se utilizaron tres concentraciones distintas para los colorantes, 2 μ M, 1 μ M y 200 nM. Las diluciones de los MitoTracker se realizaron de la misma manera que en experimento anterior. En este caso, se realizó para todos los colorantes, en primer lugar, la dilución más concentrada (2 μ M) y a continuación se llevaron a cabo diluciones seriadas hasta la concentración más diluida (200 nM).

Para el llenado de la placa se agregaron en cada pocillo 100 μ l de espermatozoides a $25 \cdot 10^6$ /ml + 100 μ l del colorante (Figura 4). Los blancos contenían únicamente 200 μ l del colorante (MitoTracker Red CMXRos, MitoTracker Orange CMTMRos y JC-1) a su concentración correspondiente (2 μ M, 1 μ M y 200 nM).

Previamente a la lectura de la placa se llevó a cabo el protocolo habitual de agitación e incubación de la misma a 37 °C.

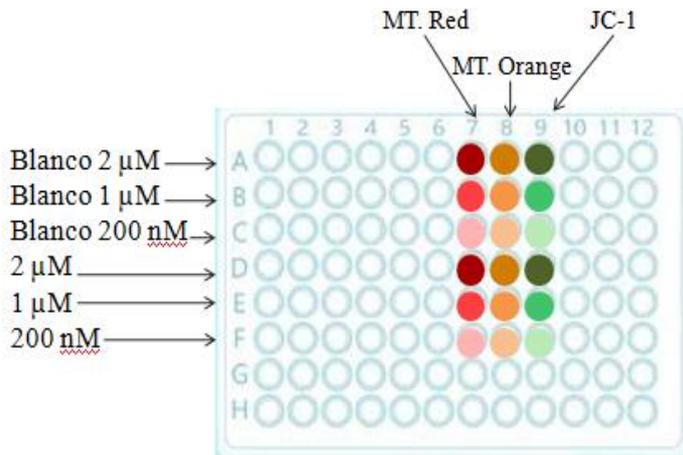


Figura 4. Representación del proceso experimental seguido para el llenado de la microplaca para la prueba con espermatozoides refrigerados. Las concentraciones de los colorantes se muestran en la parte izquierda. Las tres primeras filas corresponden a los blancos (200 μ l del colorante a la dilución indicada) mientras que las tres siguientes corresponden a las diluciones de los colorantes (100 μ l de la muestra de espermatozoides + 100 μ l de la dilución correspondiente de los MitoTracker).

3.7. Exposición de los espermatozoides al BPA

Para este experimento se pesaron 91 mg de BPA y se añadió 1 ml de DMSO como diluyente, obteniéndose una concentración stock de BPA de 400 mM (la dilución de esta a 100 mM no se tiene en cuenta). A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas de 100 mM (10^0), 32 mM ($10^{0.5}$), 10 mM (10^1), 3,2 mM ($10^{1.5}$) y 1 mM (10^2). Para ello se rellenaron 5 microtubos con 100 μ l de DMSO y se añadieron los μ l correspondientes de BPA de la manera que se observa en la figura 5.

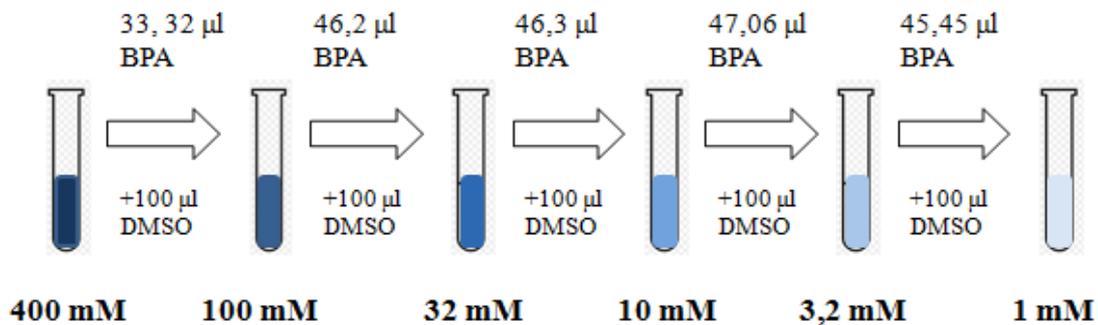


Figura 5. Representación esquemática del proceso experimental a seguir para realizar las diluciones seriadas de BPA necesarias para este experimento.

Se utilizó una concentración fija de espermatozoides a $10 \cdot 10^6$ /ml, a partir de un stock de $100 \cdot 10^6$ /ml.

Se llenaron 6 tubos con 0,5 ml de espermatozoides, uno para cada dilución de BPA + los espermatozoides muertos por congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 60°C. Seguidamente se añadieron 2,5 μ l de cada dilución de BPA a cada tubo de

espermatozoides a $10 \cdot 10^6$ /ml. Como concentraciones finales se obtuvieron 500 μ M, 158 μ M, 50 μ M, 16 μ M y 5 μ M.

Se rellenó cada pocillo de la placa agregando 200 μ l de cada uno de los 6 tubos elaborados + 6 μ l del colorante JC-1 (Figura 6). Para el blanco se utilizaron 200 μ l de BTS + 6 μ l de JC-1. Para los pocillos 0,0 se usaron únicamente 200 μ l de la dilución 10^0 de espermatozoides sin BPA + 6 μ l de JC-1.

Se tomaron medidas con el lector de placas cada media hora durante dos horas. Al finalizar cada lectura la placa se conservaba en una estufa a 37 °C hasta la lectura siguiente.

Este experimento se repitió una segunda vez utilizando citometría de flujo para el análisis de las muestras.

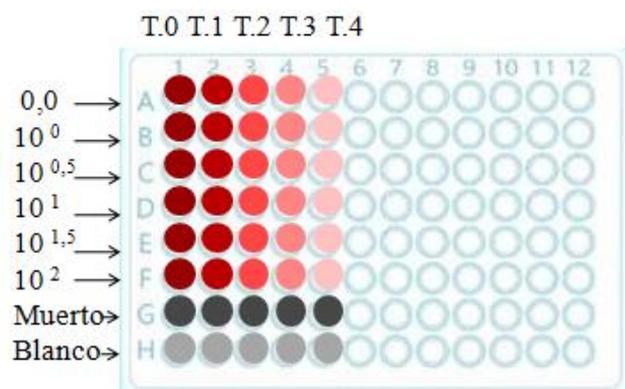


Figura 6. Representación del proceso experimental seguido para el llenado de la microplaca para el experimento del bisfenol A, utilizando los 6 tubos que contenían las 5 diluciones de BPA + los espermatozoides muertos por congelación (La dilución o el tratamiento se muestran a la izquierda). En cada pocillo se agregaron 200 μ l del tubo correspondiente y 6 μ l del colorante JC-1. Se muestran también los blancos en la parte inferior (contenían 200 μ l de BTS + 6 μ l de JC-1) y los tiempos de lectura, realizada cada media hora (T.0, T.1, T.2, T.3, y T.4).

4. Resultados

Se probaron distintas sensibilidades con el lector de placas (35, 50, 70 y 100) obteniendo resultados para cada una de ellas. Concluimos que la sensibilidad más adecuada para estos experimentos resultó ser 50, ya que esta era lo suficientemente sensible para obtener resultados precisos y, a diferencia de la de 100, no aparecían valores que resultaban imposibles de cuantificar para el aparato.

4.1. Resultados del experimento con Ioduro de propidio (PI)

Como se observa en la tabla 3 y en la figura 7, la fluorescencia obtenida mediante el lector de microplacas va disminuyendo conforme disminuye también la concentración de espermatozoides para ambos tratamientos utilizados (BTS y PI). En el caso de los espermatozoides muertos se observa una fluorescencia mínima para todas las concentraciones.

La fluorescencia obtenida es superior (en algunos de los casos casi el doble) para los espermatozoides incubados con ioduro de propidio (PI) en comparación con aquellos que presentaban únicamente BTS.

Dilución	BTS	PI	Muertos
10^0	343	694	0,494
$10^{0,5}$	176	319	0,552
10^1	83	127	0,654
$10^{1,5}$	56	64	0,875
10^2	39	52	0,750
$10^{2,5}$	36	47	0,766
10^3	36	45	0,800

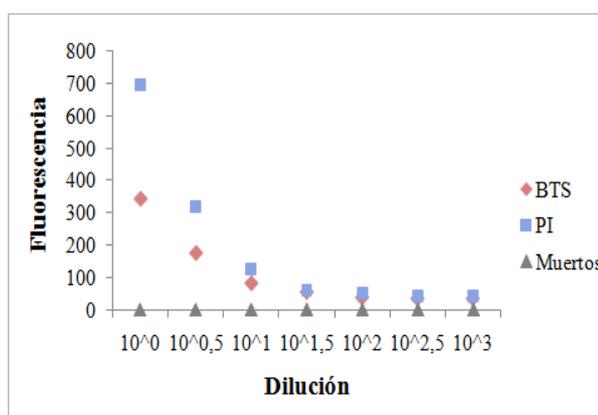


Tabla 3. Se representan los datos de fluorescencia obtenidos mediante el lector de microplacas para cada uno de los tres tratamientos (BTS, PI y espermatozoides muertos) en función de la dilución de espermatozoides aplicada.

Figura 7. Gráfica que representa la fluorescencia obtenida en función de la dilución de espermatozoides (10^0 , $10^{0,5}$, 10^1 , $10^{1,5}$, 10^2 , $10^{2,5}$, 10^3). Se representan los tres tratamientos utilizados para este experimento realizado con PI (BTS, PI y espermatozoides muertos).

4.2. Resultados del experimento de determinación de la actividad mitocondrial con fluorocromos

De las tres réplicas realizadas para este experimento, únicamente obtuvimos resultados coherentes para una de ellos, por lo que solo se tuvieron en cuenta esos datos para las gráficas. Esto podría haber ocurrido porque los colorantes de los otros experimentos se realizaron el día anterior, porque estaban estropeados, por error en el pipeteo, etc.

Los resultados de fluorescencia obtenidos para el MitoTracker Orange y para el MitoTracker Red son muy bajos (Figura 8a y 8b), encontrándose en valores muy

similares a los de las tinciones con inhibidor. Esto puede deberse a que estos fluorocromos producen demasiado fondo o a que estos son captados por otras estructuras celulares. También es posible que estos colorantes no fueran adecuados para la configuración del lector o que estos no responden bien a la excitación.

Sin embargo, la fluorescencia obtenida para el JC-1 fue alta (Figura 8c), obteniéndose valores que parecieron acordes a lo esperado. En este caso la tinción con inhibidor también mostró resultados de fluorescencia altos, aunque menores que los del MitoTracker. Se observa también cómo la fluorescencia va disminuyendo a medida que disminuye la concentración de espermatozoides.

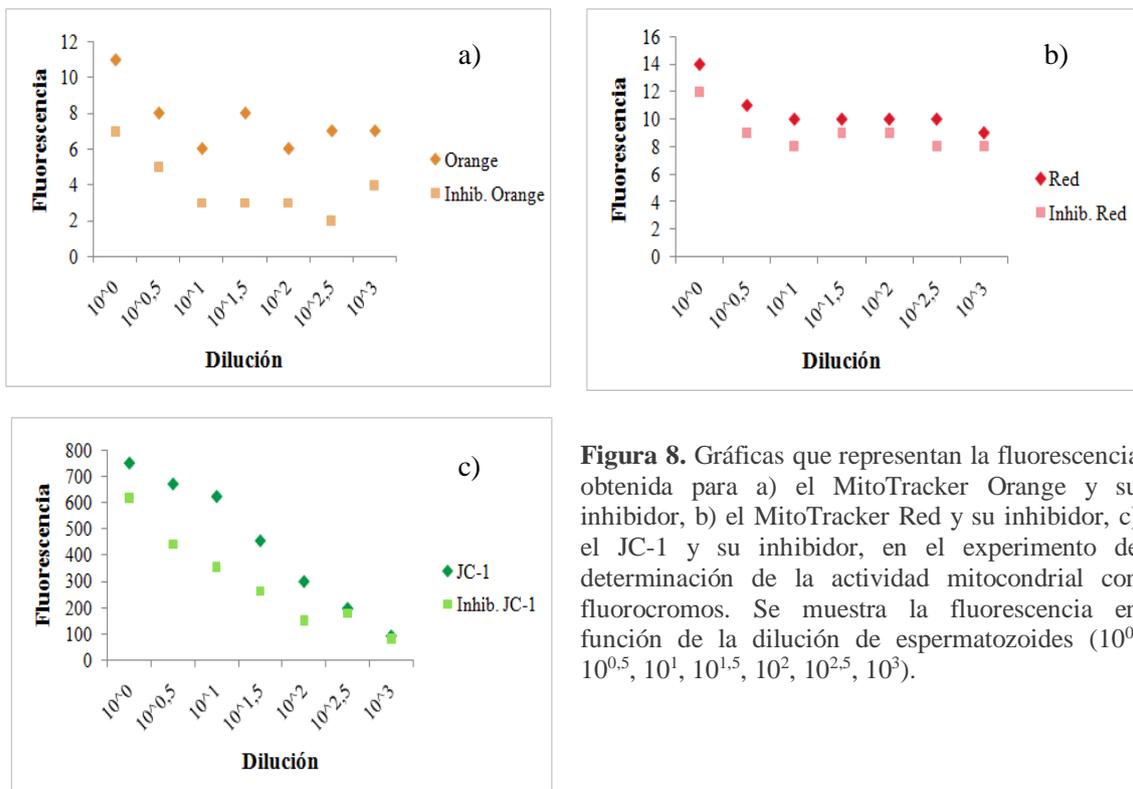


Figura 8. Gráficas que representan la fluorescencia obtenida para a) el MitoTracker Orange y su inhibidor, b) el MitoTracker Red y su inhibidor, c) el JC-1 y su inhibidor, en el experimento de determinación de la actividad mitocondrial con fluorocromos. Se muestra la fluorescencia en función de la dilución de espermatozoides (10^0 , $10^{0.5}$, 10^1 , $10^{1.5}$, 10^2 , $10^{2.5}$, 10^3).

4.3. Resultados para la prueba con espermatozoides refrigerados

Los resultados de fluorescencia obtenidos para el MitoTracker Orange y el MitoTracker Red (Figura 9a y 9b) son similares para todos los tratamientos, siendo algo mayor la fluorescencia observada para el Red. El JC-1 presenta un máximo de fluorescencia muy superior a los obtenidos para los otros dos MitoTracker en el tratamiento más concentrado (2 μ M) (Figura 9c).

En cuanto a los tratamientos, la fluorescencia es ligeramente mayor para el de 2 μM comparada con el resto de tratamientos en el caso del MT. Orange y el MT. Red, pero en el JC-1 existe una diferencia significativa entre la fluorescencia obtenida para el tratamiento 2 μM y el 1 μM . Además, los valores de los blancos para el JC-1 también se encuentran muy por encima que los obtenidos para los otros dos MitoTracker.

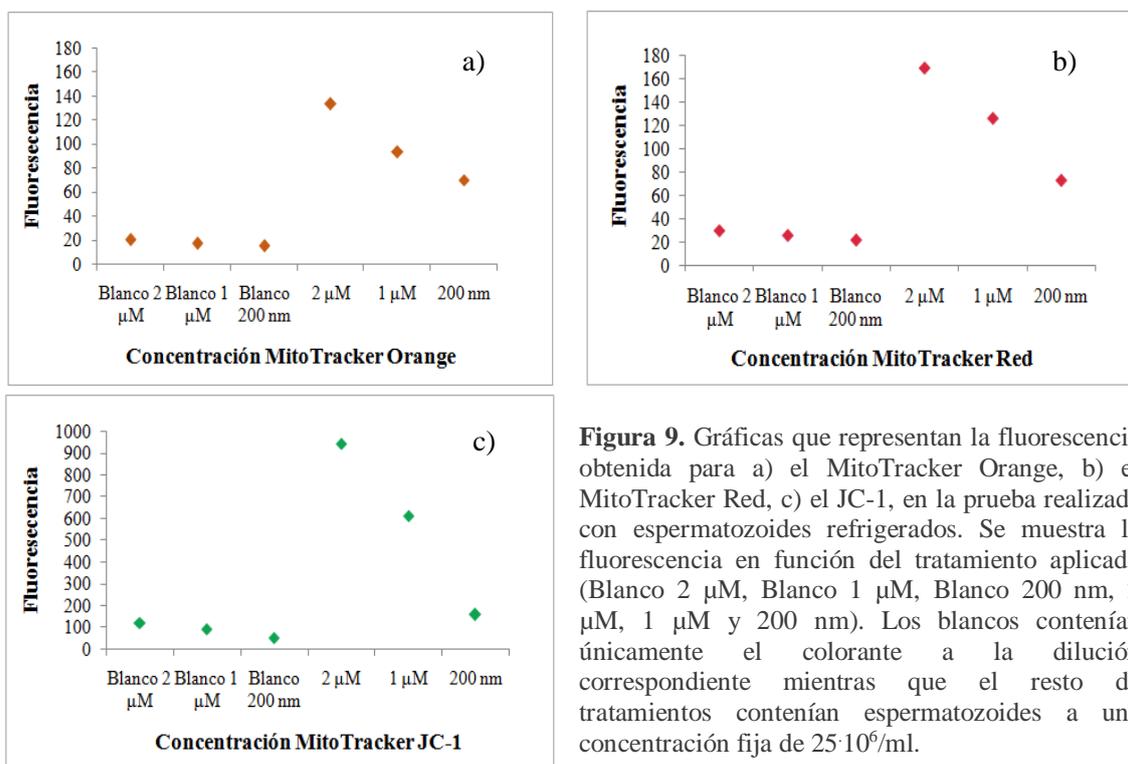


Figura 9. Gráficas que representan la fluorescencia obtenida para a) el MitoTracker Orange, b) el MitoTracker Red, c) el JC-1, en la prueba realizada con espermatozoides refrigerados. Se muestra la fluorescencia en función del tratamiento aplicado (Blanco 2 μM , Blanco 1 μM , Blanco 200 nm, 2 μM , 1 μM y 200 nm). Los blancos contenían únicamente el colorante a la dilución correspondiente mientras que el resto de tratamientos contenían espermatozoides a una concentración fija de $25 \cdot 10^6/\text{ml}$.

4.4. Resultados para el experimento de exposición de los espermatozoides al BPA

En la figura 10 se observa que el tiempo de exposición al BPA afecta a todas las dosis de manera similar, reduciéndose la fluorescencia con el tiempo para todas las dosis probadas.

En cuanto a las concentraciones, se observa que la concentración más alta de BPA es la que provoca que los espermatozoides presenten menos fluorescencia, la cual aumenta a medida que disminuye la concentración de BPA. Los resultados, por tanto, resultan coherentes con lo esperado.

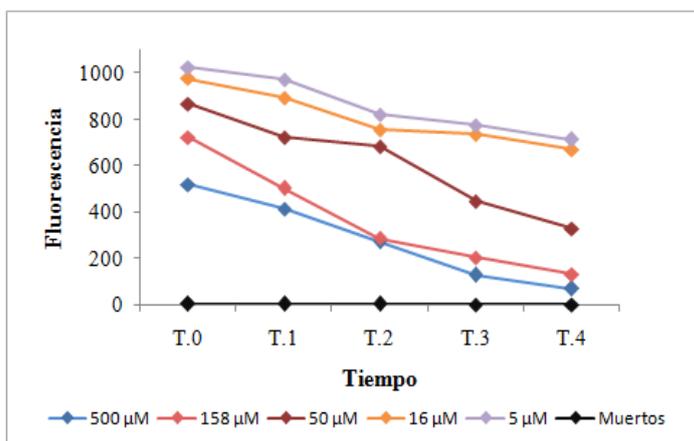


Figura 10. Gráfica lineal en la que se representa la fluorescencia obtenida para cada concentración (500, 158, 50, 16 y 5 µM) en cada uno de los tiempos (T.0, T.1, T.2, T.3, T.4) en el experimento de exposición de los espermatozoides al BPA. Se analizaron las muestras cada media hora durante dos horas. Para este experimento se utilizó una concentración fija de espermatozoides de $10 \cdot 10^6/\text{ml}$.

4.5. Resultados de la citometría de flujo

En estos resultados, hemos resumido los resultados obtenidos por citometría para la combinación de fluorocromos YO-PRO-1/PI/MitoTracker, que son los que resultan relevantes para este experimento. YO-PRO-1 es el fluorocromo que marca espermatozoides muertos o apoptóticos, PI marca espermatozoides muertos y el MitoTracker marca las mitocondrias activas.

En general, se observa que no existe relación entre el tiempo de incubación y la dosis, ya que todas las dosis se comportan de forma similar a lo largo del tiempo (Tabla 4). En cuanto a la dosis, se analizó el efecto de cada una de ellas frente al control, concluyendo que existe un efecto significativo ($p < 0,05$) únicamente para la dosis más concentrada, la de 500 µM. Esto sucede con todos los parámetros excepto con el "Ratio de apoptóticos en viables" en el que no se detectó un efecto con ningún tratamiento.

Tabla 4. Resultados de significación del test ANOVA para los modelos de tiempo y dosis. N. s.: no significativo, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Parámetro	Efecto del tiempo	Efecto de la dosis
Viables (PI -)	***	***
No apoptóticos (YO-PRO-1 -)	***	***
Ratio de apoptóticos en viables	***	n. s.
No apoptóticos con mitocondrias activas	***	***
Ratio de mitocondrias activas en no apoptóticos	n. s.	***

4.5.1. Resultados de viabilidad

Los resultados se expresan en las gráficas como Media \pm Error estándar de la Media.

En la Figura 11 se observa cómo el porcentaje de viabilidad en los espermatozoides va disminuyendo en función del tiempo de manera progresiva.

En función de la dosis encontramos distinto porcentaje de espermatozoides vivos PI -, existiendo una relación inversamente proporcional entre los dos factores, ya que cuanto menor es la dosis de BPA, mayor es el número de espermatozoides vivos.

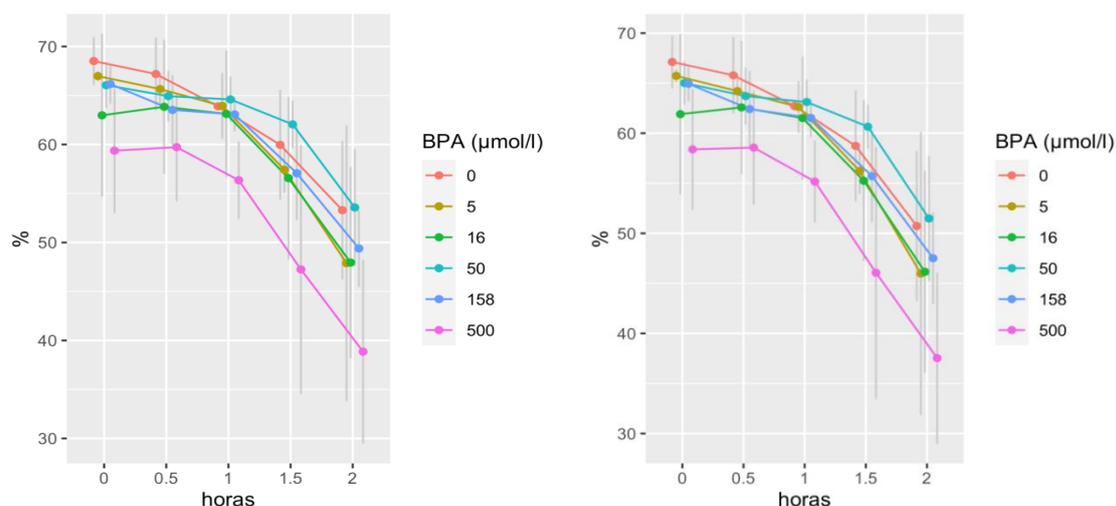


Figura 11. Gráficas resultantes del análisis por citometría de flujo de los espermatozoides expuestos al BPA. En ellas se representa a) El porcentaje de espermatozoides vivos con membrana íntegra (PI -) b) El porcentaje de espermatozoides vivos y no apoptóticos (YO-PRO-1 -) en función del tiempo (0, 0,5, 1, 1,5 y 2 horas) y de la concentración de BPA (0, 5, 16, 50, 158 y 500 μM). Se representa la media \pm SE correspondiente en cada caso.

4.5.2. Resultados de apoptosis

En la figura 12 se muestra el porcentaje de espermatozoides vivos PI - que son apoptóticos (YO-PRO-1 +). Se observa que el porcentaje de apoptóticos aumenta ligeramente a las dos horas de exposición de los espermatozoides al BPA (pasa de un 2% de apoptóticos a un 4% a las dos horas), comportándose todas las dosis de manera muy similar en el tiempo.

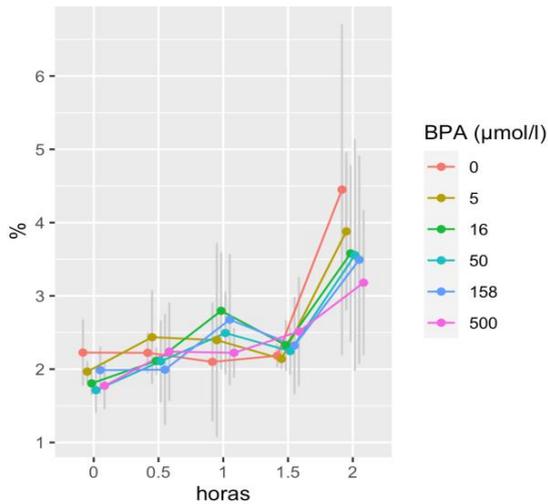


Figura 12. Gráfica resultante del análisis por citometría de flujo de los espermatozoides expuestos al BPA. En ella se representa el porcentaje de espermatozoides vivos PI – que son apoptóticos (YO-PRO-1 +) en función del tiempo (0, 0,5, 1, 1,5 y 2 horas) y de la concentración de BPA (0, 5, 16, 50, 158 y 500 µM). Se representa la media \pm SE correspondiente en cada caso.

4.5.3. Resultados de actividad mitocondrial

En cuanto a la actividad mitocondrial se observa que el porcentaje de espermatozoides con mitocondrias activas va disminuyendo en función del tiempo, presentando el porcentaje más bajo (un 40% aproximadamente) para la dosis de 500 µM a las dos horas de incubación (Figura 13).

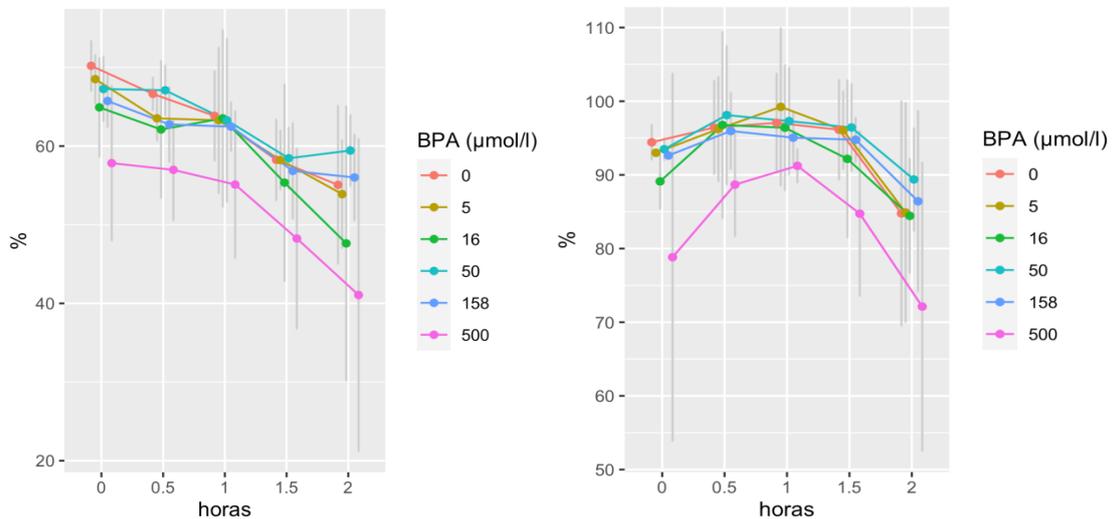


Figura 13. Gráficas resultantes del análisis por citometría de flujo de los espermatozoides expuestos al BPA. En ellas se representa a) El porcentaje de espermatozoides no apoptóticos con mitocondrias activas (MitoTracker +) b) El ratio de mitocondrias activas en espermatozoides no apoptóticos, en función del tiempo (0, 0,5, 1, 1,5 y 2 horas) y de la concentración de BPA (0, 5, 16, 50, 158 y 500 µM). Se representa la media \pm SE correspondiente en cada caso.

5. Discusión

La continua exposición al BPA a la que nos vemos sometidos (de manera ambiental y también al consumir ciertos alimentos envasados) (Vandenberg *et al.*, 2009) provoca que exista la necesidad de investigar y analizar más a fondo sus posibles efectos en la salud humana. Para realizar esta investigación, resulta necesario basarse en estudios llevados a cabo en ciertas especies animales, utilizadas con el fin de evidenciar cómo podría afectar la exposición al tóxico, sobretodo, a la reproducción humana.

En este trabajo se utilizaron espermatozoides de cerdo para estudiar los efectos que puede producir el BPA en la viabilidad y la actividad mitocondrial de las células, parámetros que se encuentran directamente relacionados con la fertilidad masculina. Se escogió la actividad mitocondrial como objeto de estudio porque resulta sencillo relacionarla con la capacidad reproductiva, pues los espermatozoides requieren de energía para conseguir una motilidad óptima, y esta energía la obtienen sobretodo de la respiración mitocondrial (Rahman *et al.*, 2015). Por tanto, cualquier afección que sufran las mitocondrias de un espermatozoide, causará alteraciones en su capacidad de fecundación.

Existen estudios toxicológicos que demuestran que ciertos contaminantes ambientales pueden acumularse en los testículos o en el epidídimo, perjudicando la calidad espermática (Danielsson *et al.*, 1984). Esto puede proporcionar a los espermatozoides ciertas ventajas en comparación con otros tipos celulares o modelos *in vitro* ampliamente utilizados en estudios de toxicidad (Seibert *et al.*, 1989). Por tanto, es preciso destacar la necesidad de realizar análisis de los espermatozoides con el fin de diagnosticar (y prevenir) ciertas afecciones reproductivas que pueden estar relacionadas con la exposición a los contaminantes ambientales.

Antes de analizar los efectos del BPA en los espermatozoides, se realizó una puesta a punto de la técnica mediante la realización de tres experimentos utilizando el lector de placas, ya que este método resulta más sencillo y económico que la citometría de flujo. Los fluorocromos catiónicos han sido ampliamente utilizados para evaluar la funcionalidad de las mitocondrias en numerosos tipos celulares, incluidos los espermatozoides (Wang *et al.*, 2003; Piasecka y Kawiak, 2003; Marchetti *et al.*, 2004) ya que estos colorantes proporcionan alta sensibilidad y son específicos de orgánulos.

Los resultados obtenidos para estos experimentos fueron variables, y la situación actual impidió poder realizar las réplicas necesarias para confirmar los resultados. Se concluyó que el colorante adecuado para las pruebas realizadas era el JC-1, ya que obtuvo una fluorescencia muy superior a la de otros MitoTracker. No deberían existir diferencias tan pronunciadas entre la fluorescencia emitida por los distintos fluorocromos, por lo que es posible que estos otros colorantes no fueran adecuados para la configuración de este lector o que no responden del todo bien a la excitación. De todas maneras, en nuestro trabajo consideramos el JC-1 como el fluorocromo ideal tras obtener buenos resultados con el mismo, siendo su uso para la tinción de espermatozoides respaldado por varios autores (Martínez-Pastor *et al.*, 2004; Vicente-Carrillo *et al.*, 2015).

En cuanto a los resultados para la prueba con espermatozoides refrigerados, no se encontraron diferencias importantes entre la fluorescencia obtenida para estos en comparación con aquellos criopreservados en nitrógeno líquido. Sin embargo, esto difiere de ciertos estudios que afirman la existencia de diferencias significativas entre los espermatozoides criopreservados y los refrigerados, revelando que la criopreservación provoca la fragmentación de los espermatozoides, la sobrecondensación de su ADN y la apoptosis de los mismos, contribuyendo así a la disminución de la fertilidad (Anzar *et al.*, 2002).

Se usó citometría de flujo para analizar los resultados del experimento de incubación de los espermatozoides al BPA. Así, nuestro trabajo respalda el uso de la citometría de flujo como una técnica adecuada para el análisis de espermatozoides, al ser altamente sensible y objetiva (Garner *et al.*, 1997; Anzar *et al.*, 2002; Love *et al.*, 2003; Hallap *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos para este experimento mostraron una relación inversamente proporcional entre la dosis de BPA y la actividad mitocondrial espermática, ya que cuanto mayor es la dosis, menor es el número de espermatozoides con mitocondrias activas. Por otra parte, se observó que todas las dosis se comportan de manera similar con el transcurso del tiempo, concluyendo que no existe relación entre el tiempo de incubación de los espermatozoides al BPA y la dosis utilizada. Sin embargo, sería necesario contemplar para el futuro la posibilidad de repetir el experimento aumentando las horas de incubación, puesto que existen trabajos que sugieren la necesidad de incubar las muestras de espermatozoides con BPA por un mínimo de 6 horas para poder observar efectos perjudiciales en los parámetros espermáticos (Rahman *et al.*, 2015).

Encontramos diferencias significativas entre la dosis de 500 μM y el control, algo que no ocurre con el resto de dosis probadas en el estudio. Barbonetti *et al.* (2016), por otra parte, señaló una disfunción mitocondrial al exponer a los espermatozoides a dosis de 300 μM , mientras que con dosis menores no encontró ningún efecto. Resulta importante destacar que, mientras Barbonetti *et al.* (2016) utiliza espermatozoides humanos, en este trabajo se usaron espermatozoides de cerdo, lo que pone de manifiesto la relevancia de la especie probada. En relación a este aspecto, Pérez Gómez (2019) expone diferencias significativas entre la sensibilidad al BPA presentada por carnero y la presentada por cerdo, de tal manera que los espermatozoides de cerdo ven afectada su motilidad en mayor medida al exponerlos al BPA. Sin embargo, Pérez Gómez (2019) observó también que la motilidad inicial de los espermatozoides de cerdo antes de realizar el experimento era mucho menor a la de los espermatozoides de carnero.

Además de la actividad mitocondrial, existen otros parámetros espermáticos que parecen verse afectados por el BPA. Rahman *et al.* (2015) y Hulak *et al.* (2013) señalaron una disminución de la motilidad al exponer a los espermatozoides a este xenobiótico. También se ha observado que los espermatozoides son especialmente susceptibles al daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS), y aunque se desconoce el mecanismo de acción del BPA sobre la producción de las mismas, ciertos autores señalan un aumento en las ROS tras la exposición al BPA (Chitra *et al.*, 2003).

En conclusión, los espermatozoides podrían ser un buen modelo de citotoxicidad, aunque habría que buscar marcadores más sensibles a las concentraciones más bajas de BPA. Su análisis mediante citometría de flujo proporciona unos resultados altamente precisos, siendo la técnica de elección en caso de contar con este equipamiento. El estudio con un lector de fluorescencia podría ser una opción más asequible, pero se necesita más trabajo para comprobar si es fiable. En este contexto, la tinción de los espermatozoides con el fluorocromo JC-1 podría ser la más adecuada para estudios de toxicidad. Considerando los efectos del BPA, en este trabajo hemos comprobado que presenta efectos significativos para la actividad mitocondrial cuando los espermatozoides de cerdo son expuestos a una concentración igual o superior a 500 μM . El resto de dosis podrían tener efectos sobre otros parámetros, por lo que sería necesario considerarlos en futuros estudios. Podemos concluir, por tanto, que el BPA interfiere con la actividad mitocondrial de los espermatozoides a dosis relativamente altas.

6. Referencias

- Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroetsch, T.G. y Pauls, K.P. (2002) "Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility", *Biology of Reproduction*, 66(2), pp. 354–360.
- Barbonetti, A., Castellini, C., Di Giammarco, N., Santilli, G., Francavilla, S. y Francavilla, F. (2016) "In vitro exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative/apoptotic mitochondrial dysfunction", *Reproductive Toxicology*, 66, pp. 61-67.
- Benachour, N. y Aris, A. (2009) "Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241(3), pp. 322–328.
- Buckman, J.F., Hernández, H., Kress, G.J., Votyakova, T.V., Pal, S. y Reynolds, I.J. (2001) "MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants", *Journal of Neuroscience Methods*, 104(2001), pp. 165-176.
- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C. y Mathur, P.P. (2003) "Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats", *Toxicology*, 185, pp. 119-127.
- Cossarizza, A., Ceccarelli, D. y Masini, A. (1996) "Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level", *Experimental Cell Research*, 222(1), pp. 84-94.
- Danielsson, B.R., Dencker, L., Lindgren, A. y Tjälve, H. (1984) "Accumulation of toxic metals in male reproduction organs", *Archives of toxicology. Supplement*, 7, pp. 177-180.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T. y Gore, A. C. (2009) "Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement", *Endocrine Reviews*, 30, pp. 293-342.
- Dodds, E.C. y Lawson, W. (1936) "Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus", *Nature*, 137, p. 996.
- Dubé, C., Beauliev, M., Reyes-Moreno, C., Guillemette, C. y Bailey, J. L. (2004) "Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation", *Theriogenology*, 62, pp. 874-86.
- Fitzgerald, R.E. y Wilks, M.F. (2014) "Bisphenol A--Why an adverse outcome pathway framework needs to be applied", *Toxicology letters*, 230, pp. 368-374.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S. y Wallace, E. (2012) "Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective", *Journal of environmental management*, 104, pp. 19-34.
- Fujimoto, T., Kubo, K. y Aou, S. (2006) "Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats", *Brain Research*, 1068 (1), pp. 49-55.
- Garner, D.L., Thomas, C.A., Joerg, H.W., Dejarnette, J.M. y Marshall, C.E. (1997) "Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa", *Biology of Reproduction*, 57, pp. 1401-1406.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. (2005) "Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633", *Theriogenology*, 63, pp. 2311-2322.

- Hulak, M., Gazo, L., Shaliutina, A. y Linhartova, P. (2013) "In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 158, pp. 64-71.
- Hulspas, R., O’Gorman, M.R.G., Wood, B.L., Gratama, J.W. y Sutherland, R. (2009) "Considerations for the Control of Background Fluorescence in Clinical Flow Cytometry", *Clinical Cytometry Society*, 76B, pp. 355-364.
- Hussain, I., Bhan, A., Ansari, K.I., Deb, P., Bobzean, S.A., Perrotti, L.I., y Mandal, S.S. (2015) "Bisphenol-A induces expression of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Regulatory Mechanisms*, 1849 (6), pp. 697-708.
- Juan-García, A., Gallego, C. y Font, G. (2015) "Toxicidad del bisfenol A: Revisión", *Revista de toxicología*, 32 (2), pp. 144-160.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L. y Feldman, D. (1993) "Bisphenol-A: an Estrogenic Substance is Released from Polycarbonate Flasks during Autoclaving", *Endocrinology*, 132 (6), pp. 2279-2286.
- Love, C.C., Thompson, J.A., Brinsko, S.P., Rigby, S.L., Blanchard, T.L., Lowry, V.K. y Varner D.D. (2003) "Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry", *Theriogenology*, 60, pp. 1127–1138.
- Ma, X.F., Zhang, J., Shuai, H.L., Guan, B.Z., Luo, X. y Yan, R.L. (2015) "IKK β /NF- κ B mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells", *Archives of biochemistry and biophysics*, 573, pp. 52-58.
- Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defosse, A., Formstecher, P. y Marchetti P. (2004) "Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility", *Human Reproduction*, 19 (10), pp. 2267-2276.
- Martínez-Pastor, F., Johannisson, A., Gil, J., Kaabi, M., Anel, L., Paz, P. y Rodríguez-Martínez, H. (2004) "Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen", *Animal Reproduction Science*, 84, pp. 121-133.
- Matthews, J.B., Twomey, K. y Zacharewski, T.R. (2001) "In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β ", *Chemical research in toxicology*, 14, pp. 149-157.
- Monici, M. (2005) "Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications." *Biotechnology Annual Review*, 11, pp. 227–256.
- Mileva, G., Baker, S.L., Konkle, A. y Bielajew, C. (2014) "Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior." *International journal of environmental research and public health*, 11 (7), pp. 7537-7561.
- Mronga, T., Stahnke, T., Goldbaum, O. y Richter-Landsberg, C. (2004) "Mitochondrial pathway is involved in hydrogen-peroxide induced apoptotic cell death of oligodendrocytes", *GLIA*, 46 (4), pp. 446-455.
- Pérez Gómez, A. (2019) "Efectos in vitro del bisfenol A sobre la motilidad en espermatozoides de carnero y cerdo". Trabajo de fin de grado. Universidad de León.

- Piasecka, M. y Kawiak, J. (2003) "Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study", *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 41, pp. 125–139.
- Rahman, S., Kang, K-H., Arifuzzaman, S., Pang, W-K., Ryu, D-Y., Song, W-H., Park, Y-J. y Pang, M-G. (2019) "Effect of antioxidants on BPA-induced stress on sperm function in a mouse model", *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47158-9>.
- Rahman, S., Kwon, W-S., Lee, J-S., Yoon, S-J., Ryu, B-Y., y Pang, M-G. (2015) "Bisphenol-A Affects Male Fertility via Fertility-related Proteins in Spermatozoa", *Scientific Reports*, 5 <https://doi.org/10.1038/srep09169>
- Rahman, S., Kwon, W-S., Ryu, D-Y., Khatun, A., Karmakar, P.C., Ryu, B-Y. y Pang, M-G. (2018) "Functional and Proteomic Alterations of F1 Capacitated Spermatozoa of Adult Mice Following Gestational Exposure to Bisphenol A", *Journal of Proteome Research*, 17, pp. 524-535.
- Seibert, H., Kolossa, M. y Wassermann, O. (1989) "Bovine spermatozoa as an in vitro model for studies on the cytotoxicity of chemicals: effects of chlorophenols", *Cell Biology and Toxicology*, 5 (3), pp. 315-330.
- Signorile, P.G., Spugnini, E.P., Mita, L., Mellone, P., D'Avino, A., Bianco, M., Diano, N., Caputo, L., Rea, F., Viceconte, R., Portaccio, M., Viggiano, E., Citro, G., Pierantoni, R., Sica, V., Vincenzi, B., Mita, D.G., Baldi, F., Baldi, A. (2010) "Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring", *General and Comparative Endocrinology*, 168 (3), pp. 318– 325.
- Silveira, P. (2016) "Estudio de la función mitocondrial espermática humana". Tesis de maestría. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A. y Vom Saal, F.S. (2005) "Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), pp. 7014–7019.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. y Soto, A. M. (2009) "Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption", *Endocrine reviews*, 30 (1), pp. 75-95.
- Vicente-Carrillo, A., Edebert, I., Garside, H., Cotgreave, I., Rigler, R., Loitto, V., Magnusson, K.E., Rodríguez-Martínez, H. (2015) "Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: Implications for drug toxicity testing and the 3R principles", *Toxicology in Vitro*, 29, pp. 582-591.
- Völkel, W., Bittner, N. y Dekant, W. (2005) "Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Drug Metabolism and Disposition*, 33(11), pp. 1748-1757.
- Vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S. y Welshons, W.V. (1998) "A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior", *Toxicology and Industrial Health*, 14 (1-2), pp. 239–260.
- Wang, X., Sharma, R.K., Gupta, A., George, V., Thomas, A.J., Falcone, T. y Agarwal, A. (2003) "Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study", *Fertility and Sterility*, 80 (2), pp.844–850.
- Xu, L-C., Sun, H., Chen, J-F., Bian, Q., Qian, J., Song, L. y Wang, X-R. (2005) "Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro", *Toxicology*, 216 (2-3), pp. 197–203.