

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“EFECTO DE LOS HERBICIDAS ATRAZINA Y
FENOXAPROP-ETIL EN LA CAPACITACIÓN Y LA
REACCIÓN ACROSOMAL *in vitro* EN ESPERMATOZOIDES
DE CERDO.”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A

RAMIRO MARAVILLA GALVÁN

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

ASESOR:

DRA. SANDRA GÓMEZ ARROYO

MÉXICO, D.F.

31 DE JULIO DE 2009.

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas de
la UAM (Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco),
aprobó la Tesis que presenta

RAMIRO MARAVILLA GALVÁN

El día 31 de Julio de 2009.

Sinodales:

Dra. Reyna C. Fierro Pastrana (Presidenta) _____

Dra. Sandra Gómez Arroyo (Secretaria) _____

Dra. Elia Roldán Reyes (Vocal) _____

Dra. María Elena Ibarra Rubio (Vocal) _____

Dr. Humberto González Márquez (Vocal) _____

COMITÉ TUTORIAL

CODIRECTORES DE TESIS

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Profesor Titular “C”

Depto. Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. Humberto González-Márquez

Profesor Titular “C”

Depto. Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

ASESORA

Dra. Sandra Gómez Arroyo

Investigadora Titular “C”

Centro de Ciencias de la Atmósfera

Universidad Nacional Autónoma de México

SINODALES

Dra. Elia Roldán Reyes

Profesor Titular “A”

FES-Zaragoza

Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Profesor de Carrera Titular “B”

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el CONACYT

convenio número 5-37923-B a Miguel Betancourt,

convenio número 52689/66955-M a Reyna Fierro,

beca de Doctorado número 176119 a Ramiro Maravilla.

Parcialmente financiado por PROMEP

convenio número UAM-I-CA11 Plaguicidas (parte 1) y

Glicoproteínas de espermatozoides (parte 2).

Bajo la Codirección de:

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Dr. Humberto González Márquez

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a la memoria de mis padres:

Esther y Ramiro

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi esposa Ofelia por su apoyo y amor.

Mis hijos: David Antonio, Ramiro Antonio, Víctor Manuel

Por enseñarme tanto de la vida.

Agradezco de manera muy especial a mis Directores de tesis: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana y Dr. Humberto González Márquez, por el invaluable respaldo e infinita paciencia, y sobre todo por su amistad y confianza que fue fundamental para la culminación de este trabajo.

Dra. Sandra Gómez-Arroyo por la revisión de esta tesis, sus acertadas observaciones y por sus invaluable consejos para mejorar la presentación de este trabajo. Sobre todo por su amistad.

Dra. Elia Roldán Reyes y Dra. María Elena Ibarra Rubio, por la revisión de esta tesis, sus acertadas observaciones y por sus invaluable consejos para mejorar la presentación de este trabajo.

Dra. Irma Jiménez, Dra. Zayil Salazar y Dr. Abel Senties por sus comentarios y sugerencias, por todo el apoyo y amistad que siempre me han brindado.

Jorge Lodigiani por la excelente digitalización de los geles.

Dr. Eduardo Casas por su amistad, su entusiasmo, y entrega a la docencia y a la investigación que siempre lo caracterizan.

Dra. Yvonne Ducolomb, Dr. Edmundo Bonilla, Dr. Miguel Betancourt, Dra. Rocío Ortiz, Dra. Leonor Rodríguez, Dra. Edith Cortés, Dra. Cristina González, por su gran apoyo.

A todos mis compañeros y amigos del Área de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud que de manera directa o indirecta me apoyaron durante mis estudios de posgrado.

Mil gracias.

“Cuánto vale un hombre”

ÍNDICE

Dedicatoria.....	v
Agradecimientos	vi
ÍNDICE.....	vii
Resumen.....	ix
Abstract.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
MADURACIÓN	4
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	6
ACROSOMA Y REACCIÓN ACROSOMAL	10
ANTECEDENTES.....	12
TRIAZINAS Y ATRAZINA.....	15
ATRAZINA	15
ARILOXIFENOXI PROPIONATOS.....	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
MÉTODOS.....	24
MUESTRAS DE SEMEN	24
EVALUACIÓN ESPERMÁTICA.....	24
CAPACITACIÓN.....	25
INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL	26

EVALUACIÓN DE LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL	26
EXPOSICIÓN A LOS HERBICIDAS	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	28
ESTUDIO BIOQUÍMICO:.....	28
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	28
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY.....	29
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)	29
GEL DE SEPARACIÓN	30
GEL DE COMPACTACIÓN.....	31
TINCIÓN.....	31
CÁLCULO DE LA MASA MOLECULAR	31
RESULTADOS.....	33
DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS HERBICIDAS.....	33
EFECTO DEL FE EN LA CAPACITACIÓN	34
EFECTO DEL FE EN LA RA INDUCIDA POR PROGESTERONA.....	35
EFECTO DE LA ATRAZINA EN LA CAPACITACIÓN.....	36
EFECTO DE LA ATRAZINA EN LA RAIP	37
ELECTROFORESIS SDS-PAGE	42
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS	60

RESUMEN

La Atrazina es un herbicida de la familia cloro-triazina usada extensamente en la agricultura. En las plantas, su principal modo de acción es la inhibición de la fotosíntesis. La Atrazina es un disruptor endocrino, que puede inducir tumores mamarios pero hay controversia en cuanto a los efectos adversos de la Atrazina en la salud humana. El Fenoxaprop-etil (FE) es un herbicida ácido de la familia ariloxifenoxialcanóico que inhibe la biosíntesis de los ácidos grasos en los meristemos de las plantas y provoca la despolarización del potencial de la membrana. Los estudios de toxicología reproductiva para estos plaguicidas y algunos de sus derivados sólo se han realizado de manera general. En la mayoría de los casos se han realizado estudios de toxicología clásica empleando animales completos. El riesgo genotóxico de agentes químicos y farmacológicos sobre células germinales es evaluado actualmente mediante ensayos *in vivo*, estos estudios son tardados y costosos, es por eso que se hace énfasis en el desarrollo de estudios *in vitro*, que además de realizarse en un periodo corto de tiempo, se obtienen resultados más rápidos y sin sacrificios de un gran número de animales. Se eligieron los herbicidas Atrazina y Fenoxaprop-etil, debido a que se utilizan de manera indiscriminada en México. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos *in vitro* de ambos herbicidas en la capacitación y reacción acrosomal (RA) en espermatozoides de cerdo. Todas las muestras estudiadas fueron clasificadas como normales. La capacitación se realizó incubando los espermatozoides de cerdo en medio TALP-HEPES. La RA espontánea se analizó después de cuatro horas de

incubación (RAE), La RA fue inducida con progesterona durante 30 minutos (RAIP). La concentración letal media (CL_{50}) fue determinada para cada herbicida (FE, 60 μ M, Atrazina 40 μ M). Se probaron los efectos de la CL_{50} , $CL_{50/2}$ y $CL_{50/5}$. La viabilidad se redujo de una manera dosis dependiente con ambos herbicidas. El FE indujo la capacitación a 60 μ M e indujo la RAE con todas las concentraciones estudiadas. La progesterona y el FE (30 μ M y 60 μ M) significativamente incrementaron la RAIP con respecto a las muestras testigo. Las poblaciones de espermatozoides expuestas a la Atrazina, tuvieron un descenso en la capacitación mientras que la RAE y RAIP se incrementaron significativamente comparadas con el testigo, en todas las concentraciones probadas.

La electroforesis de las proteínas espermáticas mostró que el tratamiento de Atrazina provoca que bandas de 85, 67, 58, 51, 26 y 18 kDa desaparezcan; las bandas peptídicas que no sufrieron modificaciones por encontrarse tanto en los espermatozoides tratados como en el grupo testigo fueron las de 30, 16 y 13 kDa; mientras que una banda de 48 kDa aparece en los espermatozoides tratados pero no en el grupo testigo (capacitados sin tratamiento). El tratamiento con FE provocó la desaparición de bandas de 85, 54, 51, 41, 26 y 18 kDa; las bandas peptídicas que no sufrieron modificaciones por encontrarse tanto en los espermatozoides tratados como en el grupo testigo fueron las de 73, 58, 34 y 13 kDa; la banda de 37 kDa aparece en los tratados con FE pero no en el grupo testigo, ni en los no capacitados. Las bandas de 94, 44, 17 y 15 kDa, que en el grupo testigo (capacitados) desaparecen, en los tratados se encuentran presentes al igual que en los no capacitados.

Estos datos indican que el FE y la Atrazina aceleran el proceso de la capacitación y la reacción acrosomal, posiblemente debido a una desestabilización de la membrana, esto se ve reflejado en cuanto al porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados, así como en las diferencias entre los patrones electroforéticos respectivos. Esta desestabilización de la membrana afecta el poder fertilizante del espermatozoide.

Palabras clave: Atrazina, capacitación, espermatozoide de cerdo, fenoxaprop-etil, reacción acrosomal.

ABSTRACT

Atrazine is an herbicide of the chloro-s-triazine family used extensively in agriculture. In plants, its principal mode of action is to inhibit photosynthesis. Atrazine disrupts endocrine signaling, which can result in the development of mammary tumors but adverse effects of atrazine on human health are controversial. Fenoxaprop-ethyl (FE) is an aryloxyphenoxyalkanoic acid herbicide that inhibits the biosynthesis of fatty acids in plant meristems and provokes depolarization of membrane potentials. The studies of reproductive toxicology for these herbicides have been done using the classical toxicological approach with complete animals. The genotoxic risk of chemical and pharmacological agents on germinal cells is evaluated *in vivo*; these assays are long and expensive, so it is emphasized in the development of *in vitro* studies, which are less expensive and faster without sacrificing a big amount of animals. Herbicides Atrazine and Fenoxaprop-ethyl were chosen because they are used extensively in Mexico. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of both herbicides on capacitation and acrosome reaction in boar sperm (AR). All sperm samples studied were classified as normal. Sperm capacitation was done by incubating boar sperm in TALP-HEPES media. Spontaneous AR was analyzed after four hours of incubation (RAE), AR was induced with progesterone for 30 min (RAIP). The median lethal concentration (LC_{50}) was determined for each herbicide (FE, 60 μ M; atrazine, 40 μ M). Effects of LC_{50} , $LC_{50/2}$ and $LC_{50/5}$ were tested. Viability was reduced in a dose-dependant manner by both herbicides; FE induced capacitation at 60 μ M, and induced RAE at all the concentrations studied. Progesterone and FE (30 μ M and 60 μ M) significantly increased RAIP with respect to

control samples. In sperm populations exposed to atrazine, capacitation was decreased while RAE and RAIP increased significantly compared to controls at all concentrations tested.

SDS-PAGE showed that Atrazine treatment provokes that the 85, 67, 58, 51, 26 y 18 kDa band lost; there were peptidic bands that did not suffer any modifications founding them in sperm treated as in controls (30, 16 y 13 kDa); the 48 kDa band appeared in treated sperm but not in the controls, sperm capacitated without treatment. FE treatment provoke the lost of 85, 54, 51, 41, 26 y 18 kDa bands, the 73, 58, 34 y 13 kD band did not sowed any change but the 94, 44, 17 y 15 proteins bands, that are lost in the control group, in the treated group are current there.

The results indicates that atrazine and FE accelerate the capacitation process and the acrosomal reaction due, probably, to a cell membrane destabilization; this is reflected in both, the percentage if capacitated and reacted sperm as well as in the electrophoretic patterns. This destabilization of the plasma membrane affects the fertilizing power of the spermatozoa.

Keywords: Acrosome reaction, atrazine, boar sperm, capacitation, fenoxaprop-ethyl.

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide constituye una célula especializada, cuyo propósito es conducir la información genética hasta el gameto femenino para unirse y formar un nuevo organismo. En los mamíferos, los espermatozoides se producen dentro de los túbulos seminíferos por medio del proceso llamado espermatogénesis. En la mayoría de los mamíferos este proceso se efectúa durante toda la vida reproductiva (Garner y Hafez, 1993).

Los espermatozoides de mamíferos son células alargadas que constan de una cabeza aplanada que contiene al núcleo y una cola con un aparato necesario para la movilidad celular, ambas estructuras, están unidas por el cuello (Garner y Hafez, 1993).

La cabeza del espermatozoide se caracteriza por presentar un núcleo de forma oval que contiene cromatina altamente condensada. La cabeza se divide en dos: La región acrosomal y la post-acrosomal. El acrosoma es una estructura situada entre la membrana plasmática y la parte anterior del núcleo. Contiene enzimas hidrolíticas que son de importancia durante la fertilización, por ejemplo hialuronidasas, esterasas (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Zayas *et al.*, 1995) y proacrosina (Tranter *et al.*, 2000). El acrosoma está subdividido en los segmentos apical, principal y ecuatorial. El flagelo está compuesto por el cuello o pieza conectora, la pieza media, la principal y la terminal. El cuello forma una placa basal en la superficie posterior del núcleo. La región del flagelo entre el cuello y el anillo se denomina pieza media, la cual junto con las piezas principal y terminal, forman el

axonema, que es el responsable del movimiento, gracias a la presencia de (Garner y Hafez, 1993).

Los espermatozoides de mamíferos son células alargadas de aproximadamente 65 μm de largo. Están compuestos por una cabeza aplanada (núcleo haploide) y un flagelo que contiene el aparato necesario para la movilidad celular, ambas estructuras están unidas por una pieza conectora. El espermatozoide entero está cubierto por la membrana plasmática. En la mayoría de las especies de animales domésticos los espermatozoides tienen tamaño y forma uniforme (Figura 1) (Garner y Hafez, 1993).

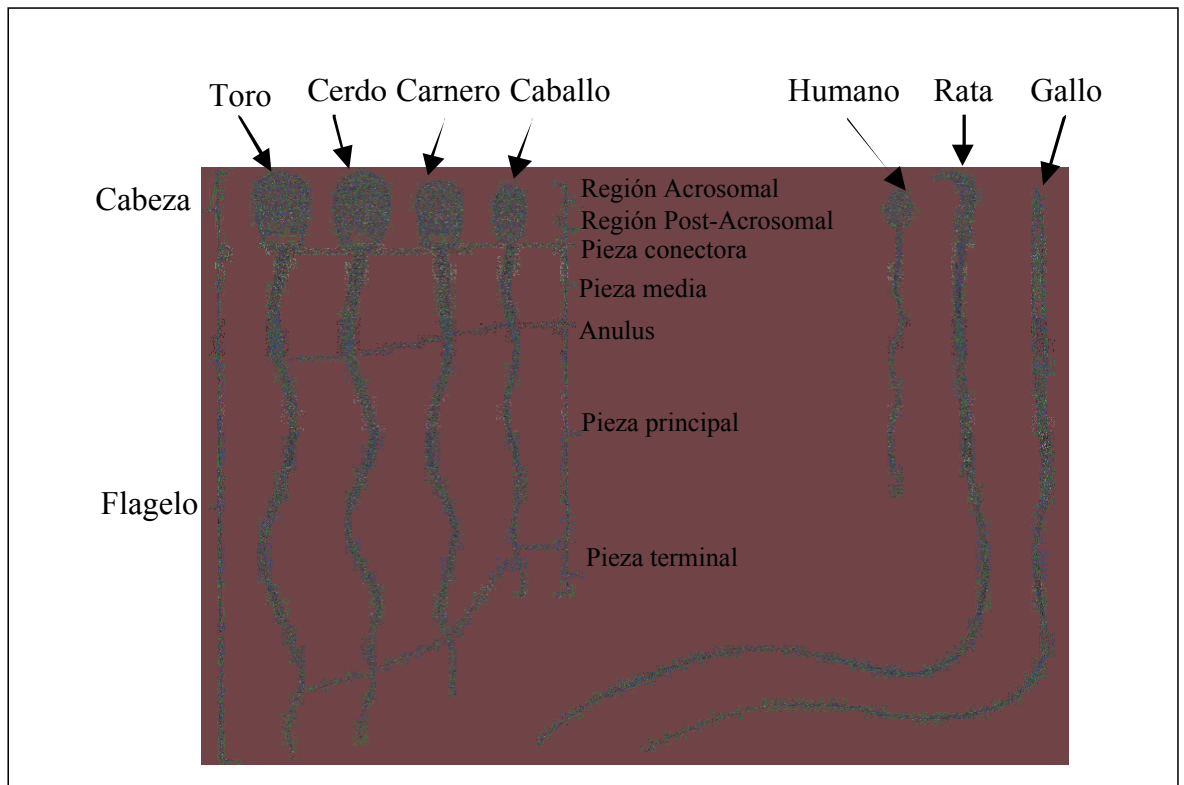


Figura 1. Comparación de espermatozoides de animales domésticos y otros vertebrados. Se observan las principales características estructurales (Garner y Hafez, 1993).

La membrana plasmática del espermatozoide está constituida por una bicapa lipídica y proteínas unidas por interacciones no covalentes, los lípidos están dispuestos en forma de una doble capa continua de 4 a 5 nm de grosor. La bicapa lipídica constituye la estructura básica y actúa como una barrera relativamente impermeable al flujo de la mayoría de moléculas hidrosolubles (Holtz, 1995). Las proteínas realizan diversas funciones: Participan en el transporte de moléculas específicas hacia el interior o exterior de la célula, actúan como enzimas o catalizadores y funcionan como receptores.

La membrana también contiene carbohidratos, que en la mayoría de los casos son cadenas de azúcares simples o polisacáridos (Flesch *et al.*, 1998). Una de las funciones importantes de estas moléculas consiste en servir como elementos de reconocimiento por parte de otras células u organismos.

Los espermatozoides después del proceso de la espermatogénesis requieren de ciertos eventos para adquirir poder fertilizante, estos son: la maduración, la capacitación y la reacción acrosomal (RA). La maduración se lleva al cabo en el epidídimo, mientras que la capacitación y la RA, en el tracto reproductor de la hembra. De esta manera sólo el espermatozoide capacitado y reaccionado puede unirse a la zona pelúcida del óvulo. Este reconocimiento es especie-específico y es un evento mediado por carbohidratos (Topfer-Petersen, 1999).

MADURACIÓN

En los mamíferos, los espermatozoides producidos en el testículo son inmaduros, inmóviles y sin la capacidad de fertilizar al ovocito. Adquieren algunas de estas propiedades al pasar por el epidídimo, donde sufren cambios fisiológicos y morfológicos que los preparan para el proceso de la fertilización. A esta serie de eventos se les conoce como maduración. Los cambios en el espermatozoide durante la maduración dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de tránsito a través del mismo. Se han recuperado fluidos de cada región del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) y se ha observado que el espermatozoide presenta diferencias en estructura y composición bioquímica, dependiendo de la región de donde sean obtenidos (Yanagimachi, 1994).

Los componentes de la membrana del espermatozoide, se expresan en las células germinales diploides y, posteriormente, son modificados durante la espermatogénesis en el testículo y también durante la maduración en el epidídimo (Yanagimachi, 1994). Estas moléculas de la superficie de la membrana plasmática son sintetizadas como precursores de alto peso molecular y, posteriormente, sufren modificaciones proteolíticas en el testículo y en el epidídimo. La manosidasa es una proteína inactiva de 135 kDa producida en el testículo y es procesada proteolíticamente a una forma intermedia de 125 kDa y finalmente a una proteína madura y activa de 115 kDa en el epidídimo (Pereira *et al.*, 1998; Phelps *et al.*, 1990; Tulsiani *et al.*, 1995a; Tulsiani *et al.*, 1995b; Tulsiani *et al.*, 1993a). Otras proteínas que son procesadas proteolíticamente son la fertilina en el cobayo (Blobel *et al.*, 1990; Lum y Blobel, 1997; Phelps *et al.*, 1990), el antígeno M42 en el ratón (Lakoski *et al.*, 1989), la glicoproteína CE9 y el antígeno 2B1 en la rata (Jones *et al.*, 1979; Petruszak *et al.*, 1991).

La maduración asociada a modificaciones de los componentes de la superficie de la membrana, no sólo se limita a procesos proteolíticos, ya que las evidencias señalan que las glicoproteínas de la membrana plasmática son extensamente modificadas cuando el espermatozoide pasa a través del epidídimo (Tulsiani *et al.*, 1993b). Estas modificaciones se deben generalmente a la adsorción/modificación de los componentes de la membrana plasmática en el lumen del epidídimo, y a modificaciones de glicoconjugados preexistentes (Tulsiani *et al.*, 1998a). Las primeras se deben a reconocimiento específico proteína-proteína, las segundas son modificaciones enzimáticas.

Las enzimas conocidas como glicoaciltransferasas agregan residuos de azúcares a una glicoproteína, y las glicohidrolasas rompen residuos de azúcares de la glicoproteínas (Tulsiani *et al.*, 1998a). Ambos tipos de proteínas están presentes en el lumen del epidídimo, por lo que se cree que modifican la membrana del espermatozoide.

Durante la maduración, además de que la membrana plasmática sufre modificaciones en su composición y organización, se favorece la actividad flagelar y la capacidad de unión a la ZP, así como redistribución de las glicoproteínas de la superficie de los espermatozoides y aumento en la cantidad de ácido siálico (Knobil, 1994; Suzuki, 1990).

CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La primera descripción de la capacitación espermática la realizó Austin en 1951 (citado en Yanagimachi, 1994). Consiste en el desarrollo funcional que sufre el espermatozoide cuando ocurre una serie de modificaciones estructurales y bioquímicas como resultado de su interacción con las secreciones de la mucosa del aparato reproductor femenino. Este proceso es indispensable para que el espermatozoide reúna las condiciones necesarias para que fertilice al ovocito. Dentro de estas modificaciones se eliminan o alteran moléculas que fueron integradas a la membrana plasmática del espermatozoide durante su maduración (Flesch y Gadella, 2000; Harrison *et al.*, 1996). También se presentan eliminación, modificación y redistribución de glicoproteínas periféricas e integrales, cambios en la estructura de fosfolípidos, pérdida de colesterol, desestabilización de la membrana plasmática y remoción de agentes descapacitantes. Estos cambios aumentan su afinidad por la

ZP (Harkema *et al.*, 2004a; Harkema *et al.*, 1998; Harkema *et al.*, 2004b), activan sitios receptores y permiten realizar la reacción acrosomal. Ésta consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, seguida por una vesiculación en el segmento anterior del acrosoma. Esto permite la liberación de las enzimas acrosomales hidrolíticas como la hialuronidasa y la acrosina (Flesch y Gadella, 2000; Gordon *et al.*, 1994; Tulsiani *et al.*, 1997).

La capacitación es un proceso gradual de desestabilización de las membranas del espermatozoide, ocurre asincrónicamente en una población heterogénea de células y culmina con la reacción acrosomal. La proporción de cada subpoblación dependerá del grado de desestabilización de la membrana espermática (Maxwell *et al.*, 1996). Así, la capacitación es un proceso que se inicia bajo condiciones específicas y no todos los espermatozoides responden a las mismas condiciones de manera sincrónica (Harrison *et al.*, 1996). El mecanismo de la capacitación es muy complejo, por ello se ha estudiado intensamente bajo condiciones *in vitro*, aunque el modelo debe ajustarse lo más posible a las condiciones *in vivo*. La capacitación se inicia en la membrana plasmática. La relación colesterol-fosfolípidos de la membrana celular decrece con la capacitación, las moléculas de albúmina presentes en el tracto reproductor femenino colaboran en secuestrar el colesterol de los espermatozoides. La pérdida de colesterol y la activación de canales específicos genera incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática y, permite el ingreso de bicarbonato (Flesch y Gadella, 2000) y del Ca^{2+} (Tardif *et al.*, 2003; Tardif *et al.*, 2001). Los carbohidratos se pierden o se redistribuyen durante la capacitación, tanto los unidos a proteínas, como a lípidos. La redistribución de glicolípidos permite la liberación de factores descapacitantes (Adeoya-Osiguwa *et al.*, 1998; Fraser, 1998a;

Fraser, 1998b), así como de otras moléculas que se unen a la membrana plasmática del espermatozoide (Topfer-Petersen *et al.*, 1998). Es posible que los carbohidratos bloqueen los sitios de reconocimiento para las proteínas de la zona pelúcida. Los cambios en los carbohidratos de las glicoproteínas involucran una disminución en las cargas como reflejo de la pérdida de los azúcares terminales cargados (Lassalle y Testart, 1994). El potencial de membrana del espermatozoide se vuelve más negativo con la salida de iones de K^+ . Este cambio en el potencial de la membrana permite la activación y entrada de los canales de calcio, cuya acción directa sobre el sistema de la tirosina cinasa en la fosforilación de proteínas ha sido difícil de examinar debido a que varios procesos requieren de calcio (Emiliozzi y Fenichel, 1997). Tanto los iones Ca^{2+} como HCO_3^- activan a la adenilato ciclasa, lo que incrementa la concentración de AMPc que activa a la proteína cinasa A. Ésta última, desencadena una cascada de fosforilación de proteínas membranales y citoplásmicas (Figura 2) (Visconti y Kopf, 1998; Visconti *et al.*, 1995b). Todos estos procesos culminan en la “capacitación espermática” (Visconti *et al.*, 1995b). En mamíferos, incluyendo el humano y el ratón, un número considerable de proteínas se fosforila por acción de la familia de proteínas tirosina cinasa durante la capacitación *in vitro* (Visconti y Kopf, 1998).

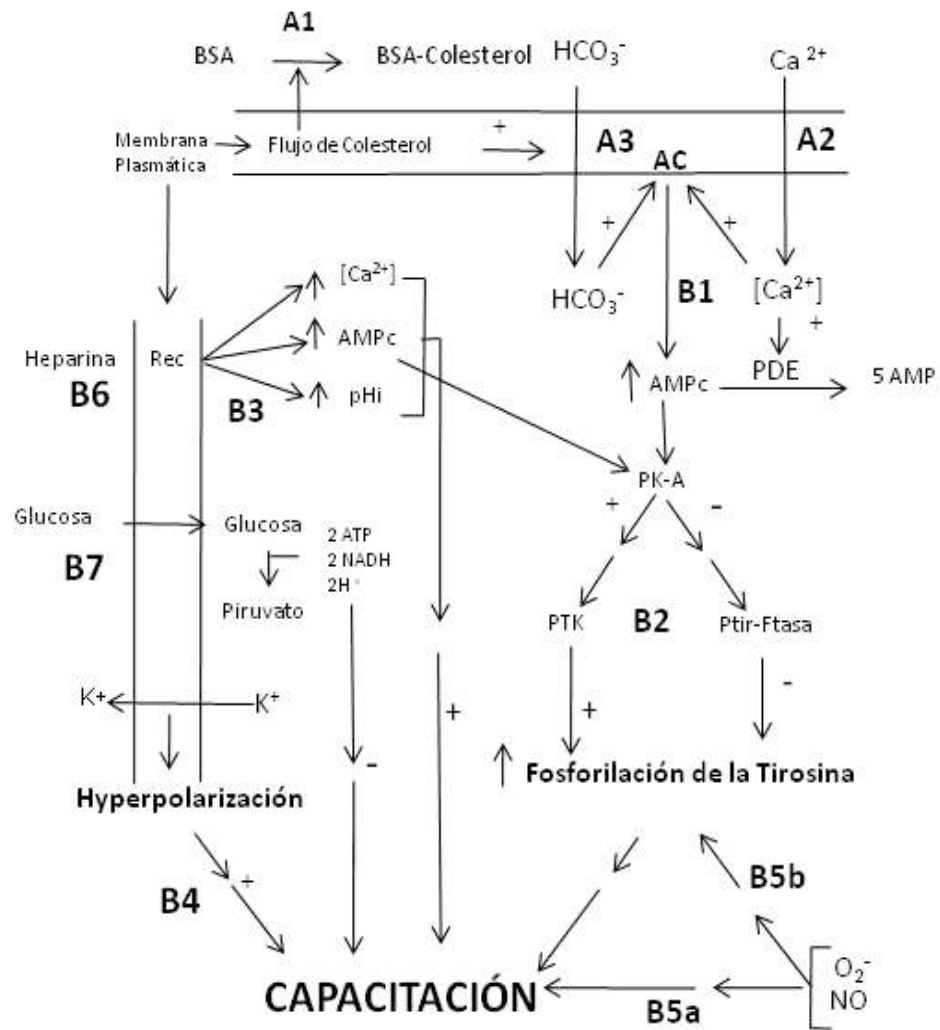


Figura 2. Representación esquemática de las rutas hipotéticas de señalización transmembranal e intracelular que regulan la capacitación en espermatozoides de mamífero (tomada de Visconti *et al.*, 1995a).

La capacitación *in vitro*, ha permitido estudiar la fosforilación de las proteínas durante la capacitación. La falta de bicarbonato, no sólo inhibe la fosforilación proteínica (Leclerc *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 1995b) sino que también disminuye la posibilidad de que el espermatozoide se una con la zona pelúcida (Harkema *et al.*, 1998). La albúmina interviene movilizándolo el colesterol, y aunque ha sido propuesta en la activación de la fosforilación, su función no es del todo clara (Emiliozzi y Fenichel, 1997; Osheroff *et al.*, 1999).

Los niveles de Ca^{2+} intracelular pueden elevarse por entrada de bicarbonato, vía canales iónicos en la membrana plasmática $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Ain *et al.*, 1999), intercambio $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Jensen *et al.*, 1999). Una explicación para la entrada de bicarbonato al espermatozoide es que los niveles de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ se encuentran en equilibrio en los compartimentos intracelulares y extracelular por la difusión del gas a través de la membrana plasmática del espermatozoide (Parkkila *et al.*, 1991). La anhidrasa carbónica presente en la cabeza del espermatozoide, podría estar involucrada en mantener altos los niveles de bicarbonato intracelular, por conversión del CO_2 que se difunde (Parkkila *et al.*, 1991).

ACROSOMA Y REACCIÓN ACROSOMAL

El acrosoma se forma durante los primeros eventos de la espermiogénesis (Moreno *et al.*, 2000). Se parece en muchos aspectos al lisosoma, ambos derivan del aparato de Golgi, tienen un pH ácido y enzimas comunes como: glicohidrolasas, proteasas, fosfatasas, aril-sulfatasas y esterasas. El contenido acrosomal es almacenado por un periodo largo en una estructura densa envuelta por una doble

membrana, la acrosomal interna y otra externa. El acrosoma de los mamíferos contiene glicohidrolasas, proteinasas, esterasas, sulfatasas, fosfatasas y fosfolipasas (Tulsiani *et al.*, 1998b; Zaneveld *et al.*, 1991).

La reacción acrosomal consiste en la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, la cual origina una vesiculación y por lo tanto, liberación del contenido enzimático del acrosoma para digerir las capas que rodean al óvulo y poder fertilizarlo. La hialuronidasa acrosomal tiene la capacidad de digerir las envolturas del ovocito para que penetre el espermatozoide (Meyers y Rosenberger, 1999). La acrosina, la beta galactosidasa y la arilsulfatasa digieren las células cúmulo de la corona radiada.

Existen evidencias sólidas de que la zona pelúcida activa a proteínas G específicamente a la proteína G1 (Brandelli *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1994) que regulan los canales de Ca^{2+} haciendo posible un flujo de iones de Ca^{2+} hacia el interior de la célula disparando la reacción acrosomal (Bailey y Storey, 1994).

Otro mecanismo inductor de la reacción acrosomal es el incremento del pH interno (Arnoult *et al.*, 1996; Zaneveld *et al.*, 1991). Este incremento es regulado por varios canales iónicos de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal (Tulsiani *et al.*, 1998b) y reportes recientes señalan que la eliminación del colesterol durante la capacitación también causa una elevación del pH (Cross y Razy-Faulkner, 1997; Florman *et al.*, 1998). El aumento del pH interno activa a la adenil ciclasa dependiente de Ca^{2+} / calmodulina, a la familia de proteínas cinasas, tiroxinas-cinasas y fosfolipasas (Florman *et al.*, 1998; Tulsiani *et al.*, 1998a).

ANTECEDENTES

La toxicología reproductiva se define como la rama de la toxicología que estudia los efectos deletéreos producidos por agentes xenobióticos en la reproducción. Estos pueden ser agentes químicos naturales y/o sintéticos, biológicos (virus) y físicos (radiaciones), que inciden en cualquiera de las etapas del ciclo reproductivo e interfieren con la fertilidad o el desarrollo pre o posnatal del individuo. En los últimos 50 años se ha observado un descenso en el recuento de espermatozoides en el hombre (de 113×10^6 gametos/mL a 66×10^6 gametos/mL) (Carlsen *et al.*, 1992; Multigner y Oliva, 2002; Swan *et al.*, 2000), así como la aparición de tumores gonadales, especialmente en países caucásicos, de tal manera que uno de cada cinco hombres presenta problemas reproductivos (Nunziata, 1998), así como algún tipo de alteración teratogénica (Zinaman *et al.*, 1996). El hecho de que estos problemas reproductivos se hayan presentado en un periodo muy breve, sugiere que pueden deberse a la exposición a agentes genotóxicos. Los mecanismos por los que estos agentes causan daño a células somáticas y germinales son, en general, poco conocidos debido, principalmente, a la carencia de sistemas *in vitro* que nos permitan evaluar su efecto, así como el de sus metabolitos y sustancias análogas sobre diversos tipos celulares. Se ha avanzado en el estudio de dichos mecanismos pero todavía no se conocen todas las partes de los mecanismos.

La identificación de los agentes que producen efectos deletéreos sobre la reproducción (reprotóxicos) se realiza tanto en animales de laboratorio como en el humano; dichos estudios son de gran importancia debido a que el ser humano se ve expuesto de manera accidental o laboral a dichos productos. En el caso de los

animales, éstos son expuestos de manera controlada siguiendo los siguientes supuestos (Schoeny, 1996):

1. Un agente que produce un efecto reproductivo adverso en animales de laboratorio puede tener ese mismo efecto en los humanos. Esto se basa en los datos comparativos entre los animales y los humanos.
2. Se asume que un agente que afecta la función reproductiva en un sexo, afectará también la función reproductiva del otro sexo, dada la similitud en los procesos biológicos de ambos sexos.
3. En ausencia de información para determinar cuál es la especie animal más apropiada para evaluar el riesgo reproductivo, se deben usar los datos obtenidos de la especie animal más sensible, ya que se ha observado que el humano lo es aún más.
4. En un análisis cuantitativo para la valoración toxicológica reproductiva, la curva dosis–respuesta será lineal a partir de cierto umbral. Esto se basa en el hecho de que las células y órganos del sistema reproductivo tienen cierta capacidad para reparar el daño producido.

Entre los agentes tóxicos más comúnmente usados, están los plaguicidas y destinados al uso agrícola, forestal, pecuario, urbano, industrial y doméstico, para controlar insectos, ácaros, roedores, hongos y malezas. Una de las características de los plaguicidas es su persistencia, es decir, la capacidad de retener sus características físicas, químicas y funcionales por un periodo determinado después de su emisión. De esta manera, los plaguicidas que más persisten en el ambiente tienen mayor probabilidad de interactuar con los elementos que conforman los

ecosistemas. Cuando su vida media y persistencia es mayor que la frecuencia con la que se aplican, los plaguicidas tienden a acumularse tanto en el suelo como en la biota.

Los plaguicidas se clasifican de acuerdo con su período de persistencia en: ligeramente persistentes (menos de cuatro semanas), poco persistentes (de cuatro a 26 semanas), moderadamente persistentes (más de un año y menos de 20 años), y permanentes (más de 20 años).

Todos los organismos son capaces de tolerar pequeñas dosis de xenobióticos gracias a sus mecanismos de homeostasis, resistencia al estrés o compensación fisiológica que incluyen la desintoxicación metabólica, la adaptación celular y la reparación. Por ello, se identifica un umbral por debajo del cual no se observan efectos adversos aparentes en las curvas que relacionan la dosis y los efectos. Por arriba de esas dosis umbral, los mecanismos de compensación se saturan y dan lugar a alteraciones en diferentes órganos o sistemas (Barberá, 1989; Ecobichon y Joy, 1984). Entre los plaguicidas usados en nuestro país y que son altamente tóxicos, se encuentran los organofosforados (diazinón), y los organoclorados (DDT, paratión) (Proctor y Casida, 1975).

TRIAZINAS Y ATRAZINA

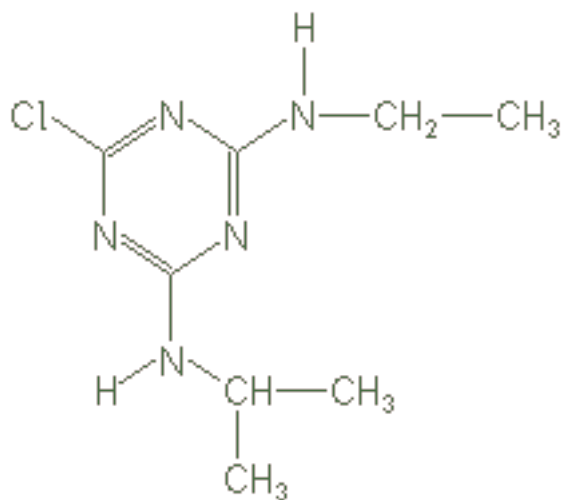
Las triazinas son estructuras heterocíclicas con tres nitrógenos.

Atrazina

Nombre de acuerdo con la IUPAC:

6-Cloro-*N*²-etil-*N*⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula química condensada: C₈H₁₄ClN₅



Formula desarrollada

Peso molecular: 215.69.

Tipo de plaguicida: Herbicida

Uso: Agrícola e industrial

Sinónimos (lista no extensiva de nombres comerciales): Atrex, Actinite Pk, 2-Aethylamino-4-Chlor-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin (Alemán), Akticon, Aktinit A, Argezin, Atazinax, Atranex, Atred, Candex, Chromozin, Crisatrina, Crisazine, Cyazin,

Pesticide Code 080803, Farmco atrazine, Fenamin, Fenamine, Fenatrol, Geigy 30,027, Gesaprim, Gesoprim, Griffex, Hungazin, Hungazin PK, Inakor, Caswell No. 063, Oleogesaprim, Pitezin, Primatol, Primatol A, Primaze, Radazin, Radizine, Vestal, Vectal Sc, Weedex A, Wonuk, Zeapos, Zeazin.

Presentaciones comerciales: Para uso exclusivo en plantas, como polvo técnico en equivalentes en gramos de ingrediente activo.

Propiedades Físico-Químicas: Es un polvo incoloro e inodoro. Punto de fusión: entre los 175 y 177°C. Densidad específica: de 1.23 g/cm³ a 22°C. Solubilidad en agua: 34.7 mg/L a 26°C. Solubilidad en otros compuestos: en DMSO 183 g/kg, en cloroformo 52 g/kg, en acetato de etilo 28 g/kg, en metanol 18 g/kg, en dietil éter 12 g/kg y en pentano 0.36 g/kg. Presión de vapor: de 2.89x10⁻⁷ mm Hg a 25°C. Constante de la Ley de Henry: de 2.96x10⁻⁹ atm m³/mol a 25°C. Esta sustancia al calentarse se descompone produciendo gases tóxicos que incluyen el cloruro de hidrógeno y óxidos de nitrógeno.

La Atrazina se usa extensamente en la agricultura de manera selectiva en ciertos cultivos y no selectiva en otros. Se aplica al suelo en pre y post-emergencia temprana (acompañado de un coadyuvante oleoso) para controlar a especies anuales de gramíneas y malezas de hoja ancha, pero su efecto es débil sobre *Digitaria spp.*, *Panicum dichotomiflorum* Michx. A dosis altas se utiliza para el control total de hierbas en áreas no cultivables (Gressel, 1984; Stevens y Sumner, 1991).

La EPA estimó que la Atrazina fue el pesticida más intensamente empleado en la protección de maíz, sorgo, caña de azúcar y piña en USA en 1999 (Donaldson *et al.*, 2002). Aunque la Atrazina continúa aplicándose, existen algunas restricciones en

las dosis y patrones de uso para reducir la probabilidad de que sus residuos lleguen al agua superficial o subterránea.

La Atrazina es un disruptor endocrino, o sea que a dosis muy bajas, puede generar trastornos en los seres humanos y otros vertebrados en el eje hipotálamo gónadas. Sus efectos adversos en animales y humanos aun no están totalmente caracterizados, pero existen muchos trabajos que los documentan, por ejemplo, la inducción de tumores mamarios (Eldridge *et al.*, 1994; Stevens *et al.*, 1994) y menopausia prematura (Chapin *et al.*, 1996; Willingham, 2004); ratas Sprague-Dawley expuestas a Atrazina en la dieta desarrollaron tumores mamarios (Simpkins *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 2005; Wetzel *et al.*, 1994), por lo que algunos autores reportan que es un potenciador de dichos tumores en ratas hembra (Chapin *et al.*, 1996). Dosis diarias de Atrazina causan disrupción del ciclo ovárico (Cooper *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2000) y atrofia de los ovarios de rata (Cooper *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 2000) y cerdo (Gojmerac *et al.*, 1996); daño neuronal del hipotálamo en ratón (Giusi *et al.*, 2006), en tortugas (Willingham *et al.*, 2000) y anfibios (Murphy *et al.*, 2006); también se reportó toxicidad reproductiva en codorniz (Wilhelms *et al.*, 2005; Wilhelms *et al.*, 2006a; Wilhelms *et al.*, 2006b; Wilhelms *et al.*, 2006c).

La Atrazina mostró tener efectos reproductivos adversos incluyendo alteraciones en la concentración de prolactina y de la hormona luteinizante cuando se les suministró a ratas durante 1 a 3 días (Cummings *et al.*, 2000a; Cummings *et al.*, 2000b). Cuando se administró Atrazina a ratas en gestación los resultados

fueron aborto o camadas con bajo peso, debido a la inhibición de la hormona luteinizante (Narotsky *et al.*, 2001).

En ratas macho se observó una disminución en el peso corporal así como en el peso relativo de la hipófisis y la próstata cuando se suministraron entre 60 y 120 mg de Atrazina por un período de 60 días; el análisis histológico del tejido testicular mostró cambios morfológicos y una reducción del número de espermatozoides del epidídimo así como disminución en su movilidad después de eyaculados (Kniewald *et al.*, 2000).

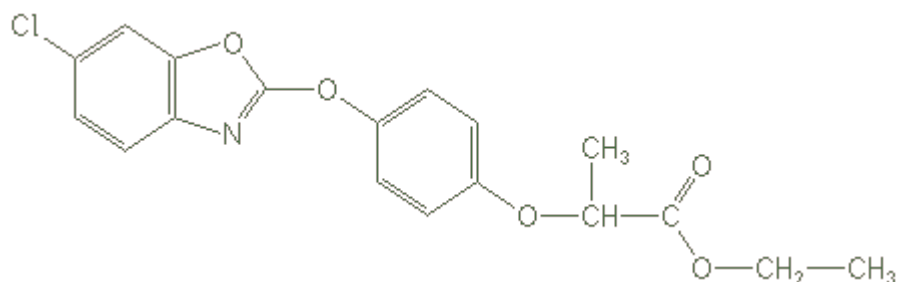
ARILOXIFENOXI PROPIONATOS

Esta clase de herbicidas es una familia de compuestos con gran actividad contra todos los pastos. Se aplica a la mayoría de los cultivos de hoja ancha con muy poco riesgo de daño al cultivo. Aplicados a dosis más altas se ha observado alguna actividad en el suelo. En los pastos, estos compuestos son rápidamente traslocados del punto de absorción al meristemo en crecimiento. Aparentemente el clima tiene poco efecto en su actividad. Es notable que todos son efectivos contra el pasto Johnson.

Nombre de acuerdo con la IUPAC:

ácido 2-(4-((6-cloro-2-benzoxazolil)oxi)fenoxi) propanoico etil

Fórmula química condensada: $C_{18}H_{16}ClNO_5$



Formula desarrollada

Peso molecular: 291.38

Tipo de plaguicida: Herbicida

Uso: Agrícola e industrial

Sinónimos: Furore, Option, Puma, Whip.

Presentaciones comerciales: Como concentrado emulsionable y como emulsión aceite en agua.

Propiedades Físico-Químicas: Sólido incoloro cuyo punto de fusión se encuentra entre los 84 y 85°C. Solubilidad en agua: 0.9 mg/L a 25°C. Solubilidad en diferentes compuestos a 20°C: >0.5% en hexano, >1% en ciclohexano, etanol y 1-octanol, >20% en acetato de etilo, >30% en tolueno y >50% en acetona. Presión de vapor: 0.19×10^{-5} Pa a 20°C.

Persistencia: Medianamente persistente. En suelo es eliminado en poco tiempo, en 6 días sus concentraciones disminuyen por debajo de los límites de detección. Sus principales productos de degradación son la 6-clorobenzoxazolinona, el etil 2-(4-hidroxfenoxi)propanoato y el Ácido 2-(4-hidroxifenoxi) propanoico. El compuesto es susceptible a la hidrólisis y prácticamente no se volatiliza.

El FE es altamente tóxico para el zooplancton, moderadamente tóxico para crustáceos y prácticamente no tóxico para aves. Inhibe la biosíntesis de lípidos y se usa para cultivos de hoja ancha y gramíneas; se absorbe por las hojas y su acción se localiza en los centros de crecimiento, donde afecta a los meristemos apical y subapical; su principal sitio de acción bioquímica es la inhibición de la acetil Coenzima A carboxilasa que participa en la biosíntesis de lípidos en las especies gramíneas susceptibles (Hjorth *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2003; Ruiz-Santaella *et al.*, 2006a; Ruiz-Santaella *et al.*, 2006b; Zhang y Powles, 2006).

Se han realizado estudios con el Fenoxaprop-etil sobre el impacto que tiene en los suelos y las comunidades microbianas (Grabinska-Sota *et al.*, 2000), como por ejemplo la inhibición del crecimiento del parásito *Toxoplasma gondii* se ha correlacionado con la inhibición de la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC) (Zagnitko *et al.*, 2001). En nuestra revisión bibliográfica se encontró que no se han realizado estudios del efecto del FE en el sistema reproductor de mamíferos. Los trabajos encontrados principalmente versan sobre los efectos que tiene en suelos y en sus comunidades microbianas (Berger, 1999; Chiang *et al.*, 1997; Grabinska-Sota *et al.*, 2000; Ravanel *et al.*, 1999; Singh y Dureja, 2000; Vischetti y Esposito, 1999).

JUSTIFICACIÓN

La importancia del estudio de los efectos de los plaguicidas sobre los organismos que no son su blanco se encuentra en definirlos precisamente revelando los mecanismos secundarios. En años recientes, se ha registrado un interés creciente en el efecto de la exposición ambiental y ocupacional a contaminantes tóxicos, en la disminución de concentraciones espermáticas e infertilidad masculina. La evaluación del impacto de los plaguicidas sobre la salud reproductiva es incipiente. Desde hace más de una década, datos preliminares indicaban que algunos plaguicidas pueden afectar la reproducción induciendo cambios funcionales sutiles, por eso es necesario realizar más estudios para evaluar los efectos adversos de los insecticidas y herbicidas.

El riesgo genotóxico de agentes químicos y farmacológicos sobre células germinales es evaluado actualmente mediante ensayos *in vivo*, estos estudios son tardados y costosos, es por eso que se hace énfasis en el desarrollo de estudios *in vitro*, que además de realizarse en un periodo corto de tiempo, se obtienen resultados más rápidos y sin sacrificios de animales. Hasta donde sabemos, hay muy pocos estudios en células gaméticas a nivel de la capacitación y la reacción acrosomal *in vitro*. Éstos permiten dilucidar parte de los mecanismos de acción de los plaguicidas en condiciones controladas. El presente trabajo tiene la ventaja de emplear células germinales de cerdo, el cual es un buen modelo por su similitud bioquímica y fisiológica con el humano. Se eligieron los herbicidas Atrazina y Fenoxaprop-etil debido a que se utilizan de manera indiscriminada en México.

HIPÓTESIS

Los plaguicidas tienen efectos tóxicos sobre las células espermáticas en roedores, y dado que los procesos de maduración de gametos están muy conservados en las diferentes especies de mamíferos, se espera encontrar una disminución en el porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados en el cerdo.

La capacitación es un proceso en donde hay una remodelación de la estructura de la membrana plasmática del espermatozoide. Esta remodelación involucra el desprendimiento, rearreglo y posiblemente cambios bioquímicos tanto de los carbohidratos como de los péptidos. El patrón proteínico de los espermatozoides de cerdo tratados con los herbicidas será diferente del de los no tratados.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad de los herbicidas Atrazina y Fenoxaprop-etil, en un sistema de cultivo *in vitro* de espermatozoides de cerdo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto tóxico en la viabilidad de espermatozoides expuestos a los herbicidas Atrazina y Fenoxaprop-etil.
2. Determinar la CL₅₀ de cada uno.
3. Evaluar el efecto en la capacitación y la reacción acrosomal en espermatozoides expuestos a diferentes concentraciones de herbicidas.
4. Determinar el patrón proteínico de los espermatozoides expuestos a los herbicidas durante la capacitación y compararlo con el de los no expuestos.

MÉTODOS

MUESTRAS DE SEMEN

Se obtuvieron muestras de semen de cerdos sanos en edad reproductiva. Los eyaculados se colectaron por el método de la mano enguantada. Estas muestras fueron transportadas en un termo a una temperatura de 38°C con el fin de conservarlas en buenas condiciones para su inmediata evaluación en el laboratorio.

EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

La movilidad progresiva se determinó por observación directa al microscopio óptico a 200X y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles. La concentración se determinó haciendo una dilución 1:1000 del semen fresco en agua destilada, se colocó una alícuota en una cámara de Neubauer, y se realizó el conteo por observación directa al microscopio óptico a 200X.

La viabilidad y anomalías morfológicas fueron determinadas por medio de la técnica de Eosina/Nigrosina de acuerdo a los criterios descritos (Flowers, 1997; Garner y Hafez, 1993; Jouannet *et al.*, 1988; Knobil, 1994; Rillo *et al.*, 1996). La muestra fue diluida con el colorante a una proporción de 3:1, se realizó un frotis y se dejó secar a 37 °C. Se observó al microscopio óptico para contar 100 células y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Se consideran como espermatozoides vivos aquéllos que no presentan tinción, y como espermatozoides muertos, los teñidos en color rojo.

Con base en estas observaciones, se determinó si las muestras eran normozoospermicas de acuerdo con criterios previamente descritos (Garner y Hafez, 1993): más del 80 % de movilidad progresiva y de viabilidad, y menos del 10 % de anomalías espermáticas. Para este trabajo sólo se utilizaron muestras normospermicas. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). El agua utilizada en la preparación de las soluciones fue calidad Milli-Q (Millipore).

CAPACITACIÓN

El semen fue lavado dos veces con solución salina de fosfatos de Dulbecco (DPBS). Se centrifugó a 600 g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en un mililitro de DPBS. De los espermatozoides lavados se tomaron 5×10^6 células y se depositaron en una caja de plástico de cuatro pozos (Nunc, Roskilde Denmark) con medio TALP-HEPES suplementado con albúmina sérica bovina fracción V (BSA) (6mg/mL) y Piruvato de Sodio 1 mM (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) a un pH de 7.4 y fueron incubados (Incubadora Lab-Line Instruments, Inc.) durante cuatro horas a 39 °C, en una atmósfera húmeda y con 5 % de CO₂ (Bonilla *et al.*, 1994). Para el estudio bioquímico las muestras se procesaron como se describió anteriormente pero se tomaron 7×10^6 /mL y se colocaron en botellas de cultivo (Nunc, Roskilde Denmark) en 500 mL de medio TALP-HEPES (Jimenez *et al.*, 2003).

INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL

Después del tiempo de capacitación, se indujo la reacción acrosomal mediante la adición de progesterona (Sigma Chemical, St Louis MO., USA) a una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$ (RAIP) y se dejó incubar durante 30 minutos en las mismas condiciones (Berger, 1990).

La reacción acrosomal espontánea no inducida con la progesterona, fue denominada con las siglas RAE.

EVALUACIÓN DE LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL

Estos procesos se evaluaron mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) (Fraser, 1990). La CTC se preparó a una concentración de 750 μM en 20 mM de Tris, 130 mM de NaCl, 5 mM de L-cisteína a un pH de 7.8. Después de la incubación, los espermatozoides se centrifugaron a 600 g por 5 minutos, se resuspendió el botón con 10 μl de glutaraldehído al 0.2 % en Tris 0.5 M a un pH de 7.4. En un portaobjetos se mezclaron 5 μl de espermatozoides con 5 μl de CTC, posteriormente se le agregaron 10 μl de 1.4-diaza-biciclo(2.2.2) octano (DABCO) al 0.22 M en glicerol al 90 % para conservar la fluorescencia. Se observaron las laminillas en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, Alemania) a un aumento de 1000X bajo luz ultravioleta a 495-nm para excitar la CTC y determinar el estado funcional de los espermatozoides. Se contaron 200 espermatozoides y se clasificaron de acuerdo con los siguientes patrones de fluorescencia descritos por otros autores (Conejo-Nava *et al.*, 2003; Maxwell y Johnson, 1997; Wang *et al.*, 1995):

Patrón F: fluorescencia uniforme en la cabeza y acrosoma intacto, característica de espermatozoides sin capacitar.

Patrón B: la fluorescencia se concentra en la región acrosomal y una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal. Característica de que el espermatozoide está capacitado con el acrosoma intacto.

Patrón AR: no presenta fluorescencia en la cabeza, excepto una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial. Espermatozoide reaccionado.

EXPOSICIÓN A LOS HERBICIDAS

Los herbicidas Atrazina y FE, se usaron en grado técnico (Aventis CropScience, Cajeme, Sonora, México), en su presentación comercial Bayer CropScience y Puma Súper, respectivamente. Se preparó una solución stock de 10 mM en etanol absoluto, el cual se utilizó para diluirlos.

Para determinar la concentración letal media (CL_{50}) se probaron diferentes concentraciones de los herbicidas, y del etanol a la máxima concentración usada para diluir los herbicidas. Se realizaron incubaciones durante cinco horas.

Una vez establecida la CL_{50} para cada uno de los compuestos, se probaron las concentraciones $CL_{50/5}$, $CL_{50/2}$ y CL_{50} para cada uno de ellos y para cada condición de espermatozoides: capacitados y reaccionados. En los estudios de capacitación y de RAIP, los herbicidas fueron agregados al comienzo del período de incubación. Asimismo, se realizó un testigo sin plaguicida. Los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores de la CL₅₀ fueron calculados usando el programa de análisis Probit (Finney, 1978) obtenido del sitio de Internet de la EPA (U.S. Environmental Protection Agency, 2007). Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Los datos de la capacitación y reacción acrosomal se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney que implica el análisis de todos los datos y no una medida de tendencia central. El nivel de confianza fue de $P < 0.05$.

ESTUDIO BIOQUÍMICO:

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La extracción de proteínas fue realizada de acuerdo con la técnica descrita por Runnebaum y col. (1995). Al paquete celular, se le agregaron 4 volúmenes iguales (4 mL) de colato de sodio al 1% en PBS/1mM PMSF (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo) y benzamida 1 mM a un pH de 7.2, por medio de agitación suave. Se mantuvo en refrigeración durante 24 horas. Transcurrido este tiempo el extracto celular fue centrifugado a 5,000 g por 10 minutos, se colectó el sobrenadante y fue centrifugado a 50,000 g durante 30 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante conteniendo las proteínas totales y se conservó a -20 °C.

Posteriormente el extracto proteínico se depositó en una membrana de diálisis previamente tratada. Se dializó en el amortiguador de unión (Tris-HCl a 20 mM, NaCl al 0.5 M), conteniendo PMSF 1 mM, Benzamida 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas a un pH de 7.4 durante 24 horas en refrigeración, con el fin

de eliminar los restos del detergente y ajustar la muestra a la concentración del amortiguador de unión.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

Se determinó la concentración de proteínas por medio del método de Lowry (1951). Se tomaron 25 μ L de la muestra y se llevaron a un volumen final de 100 μ L con agua destilada, se añadieron 100 μ L de solución ABC (solución A : Na_2CO_3 al 10 % en NaOH al 0.5 M, Solución B: tartrato de Na y K al 2 %, Solución C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1 %). Se mezclaron 5 mL de sol. A, 0.15 de B y 0.15 de C), se agitó la solución con la ayuda de un vórtex y se dejó reposar por 15 minutos. Se agregaron 300 μ L de reactivo de Fenol Folin-Ciocalteu diluido 1:10 con agua destilada, se dejó reposar la muestra por 45 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 600 computarizado. Se preparó una curva estándar de albúmina bovina para interpolarla con la absorbancia obtenida y se determinó la concentración de proteínas.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)

El análisis electroforético fue realizado de acuerdo con el método reportado por Laemmli (1970). Se preparó el gel de separación al 12.5 % y el gel de compactación al 4 % en condiciones reducidas. Para cada fracción (PR y PNR), se precipitaron 50 μ g de proteína con 4 volúmenes de acetona fría, se incubó por 10 minutos en hielo. Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. El botón se disolvió en 20 μ L de amortiguador de muestra (10 % SDS, 50 % glicerol/azul de

bromofenol 5 % 2-β-mercaptoetanol, y Tris-HCl 0.5M pH 6.8) y se calentó a 100 °C por 3 minutos. Las fracciones se colocaron en cada carril y el gel se resolvió en una cámara Mini-Protean II (Bio-Rad). A 200 V durante 45 minutos en un amortiguador de corrimiento preparado con Tris 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS al 1 %. Los geles monodimensionales se fijaron en una solución de ácido acético al 10 % v/v, etanol al 40 % v/v y agua desionizada durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie al 0.025 % durante 2 h. Se decoloraron con ácido acético al 10 % v/v hasta que el fondo de los geles se mostró totalmente claro.

Los geles teñidos fueron digitalizados y analizados. Se realizaron tres geles, cada uno de un experimento diferente. Las masas relativas Mr fueron determinadas con un estándar (SDS-PAGE), de baja masa molecular (BioRad 161-0304).

Gel de Separación

Se preparó un gel de separación al 12.5% de la siguiente manera: se mezclaron 5 mL de acrilamida al 30% (Acrilamida/Bis acrilamida Bio-Rad en proporción de 37.5:1, 2.6% C), 2.34 mL de agua desionizada, 2.5 ml de amortiguador Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, se desgasificó con una bomba de vacío durante 15 minutos. Inmediatamente después se agregaron 100 µL de SDS, 50 µL de APS (Persulfato de amonio Bio-Rad) al 10% y 5 µL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina, Bio-Rad) al 0.01%. Se llenó la cámara electroforética Miniprotean II previamente armada con separadores de 0.75 mm, se añadieron unas gotas de isobutanol y se dejó polimerizar al menos una hora.

Gel de Compactación.

Se preparó un gel de compactación al 4 %, con 1.33 mL de Acrilamida al 30 %, 6.1 mL de agua desionizada, 2.5 mL de amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, se desgasificó con una bomba de vacío durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 100 μ l de SDS 10 %, 50 μ l de APS al 10 %, 10 μ l de TEMED se colocó entre los vidrios y se dejó polimerizar al menos 20 minutos antes de colocar la muestra.

TINCIÓN

Los geles se colocaron en una solución fijadora de etanol-ácido acético proporción 50:10 % durante 12 h, posteriormente se depositaron en la solución "A" de Azul de Coomassie al 0.025 %, propanol-ácido acético 10:10 % durante 30 minutos. Después de este tiempo se colocaron en la solución (B) de Azul de Coomassie al 0.0025 % en propanol-ácido acético 10:10% durante 30 minutos. Para retirar el exceso de colorante se lavaron varias veces con una solución de ácido acético al 10 %.

CÁLCULO DE LA MASA MOLECULAR

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS es un método analítico en el que al aplicarle una diferencia de potencial, las proteínas se separan por tener diferente masa. Al graficar el R_f VS el Log del PM de estándares conocidos (marcadores) se obtiene un modelo lineal que es usado para la estimación de los de las masas relativas de las bandas individuales. El R_f se calcula dividiendo la

distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por la banda que más avanzó. La movilidad electroforética relativa (R_f) es inversamente proporcional al logaritmo de la masa molecular.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS HERBICIDAS

La toxicidad se determinó incubando a los espermatozoides con diferentes concentraciones de cada uno de los herbicidas, durante 5 horas. La más alta concentración de etanol absoluto usada en este estudio para diluir a los herbicidas fue de 1%, la cual no tuvo efecto significativo en la viabilidad de los espermatozoides tratados comparados con el grupo testigo (80 ± 4 VS 81 ± 3 , $P= 0.45$).

El efecto de las diferentes concentraciones de los herbicidas en la viabilidad de los espermatozoides, se muestra en la Tabla 1. El tratamiento con FE causó una disminución en la viabilidad de una manera dosis dependiente con una CL_{50} , de $55.6 \mu M$ con 95% de límites de confianza de 47.7 a $63.1 \mu M$. El tratamiento con Atrazina mostró disminución en la viabilidad de una manera similar al tratamiento con el FE. La CL_{50} fue de $37.5 \mu M$, con 95% de límites de confianza de 29.6 a $44.5 \mu M$. La CL_{50} usada para FE fue de $60 \mu M$ y para la Atrazina de $40 \mu M$, porque esos valores están dentro del intervalo de confianza.

Tabla 1. Efecto de los herbicidas en la viabilidad de espermatozoides de cerdo para determinar la CL₅₀.

Viabilidad (%) $\pm$ DS			
μ M	Fenoxaprop-etil	μ M	Atrazina
0	84 $\pm$ 3	0	80 $\pm$ 1
40	55 $\pm$ 7	20	60 $\pm$ 4
50	48 $\pm$ 4	40	37 $\pm$ 3
60	41 $\pm$ 2	60	27 $\pm$ 2
100	15 $\pm$ 3	100	6 $\pm$ 3

La viabilidad fue evaluada mediante la técnica de eosina-nigrosina. Los resultados son el promedio de cinco ensayos.

EFFECTO DEL FE EN LA CAPACITACIÓN

La viabilidad de los espermatozoides capacitados en presencia de FE, disminuyó significativamente de una manera lineal, lo que concuerda con los datos que se obtuvieron para determinar la CL₅₀.

El grupo testigo alcanzó más del 50% de capacitación, lo cual está de acuerdo con los resultados que se obtienen de manera rutinaria en el laboratorio y por otros autores (He *et al.*, 2001; Jimenez *et al.*, 2006). En espermatozoides expuestos a 12 μ M, la capacitación se redujo significativamente ($p < 0.05$) llegando a ser el 85% del

testigo. Los no capacitados no cambiaron pero la RAE se incrementó hasta 1.6 veces el testigo (Figura 3A, Tabla 2).

A una concentración de 30 μM de FE, la proporción de espermatozoides capacitados se mantuvo igual al valor encontrado con el tratamiento con 12 μM ; los espermatozoides que sufrieron la RAE incrementaron hasta 2.3 veces la proporción encontrada en el testigo ($p \leq 0.05$) (Figura 3A, Tabla 2) y ésta fue significativa comparada con la obtenida en 12 μM .

Los tratamientos con 60 μM causaron un aumento 1.1 veces en la capacitación de los espermatozoides con respecto al testigo, y a concentraciones inferiores a ésta ($p \leq 0.05$), los espermatozoides no capacitados disminuyeron 27% respecto del testigo. Sin embargo, la proporción de espermatozoides que desarrollaron RAE disminuyó significativamente comparado al grupo expuesto a 30 μM ($p \leq 0.05$), contrariamente, registró un incremento de 1.3 respecto del grupo testigo (Figura 3A, Tabla 2).

EFFECTO DEL FE EN LA RA INDUCIDA POR PROGESTERONA

La RA observada en los espermatozoides del grupo testigo, inmediatamente después de la capacitación (RAE) fue del 17 % (Figura 3A, Tabla 2); después de 30 min de inducción, la RAIP se incrementó hasta ser el 30% de los espermatozoides de la muestra (Figura 3B, Tabla 3) ($P \leq 0,05$).

Los tratamientos de FE a una concentración de 12 μM no tuvieron efecto significativo en la capacitación ni en la RAIP.

En los tratamientos con 30 μM , los espermatozoides no capacitados disminuyeron con respecto a los tratados con 12 μM y al testigo ($p \leq 0.05$). Los espermatozoides capacitados también disminuyeron con respecto a los tratados con 12 μM de FE pero no con respecto al testigo, mientras que la RAIP se incrementó significativamente con respecto a los espermatozoides tratados con 12 μM y aumentó hasta 1.7 veces respecto al testigo ($p \leq 0.05$).

La concentración de 60 μM mostró niveles de la RAIP similares al testigo, pero significativamente distintos a la respuesta encontrada con los tratamientos de 30 μM ($p \leq 0.05$). Además, los espermatozoides no capacitados disminuyeron significativamente con respecto a los tratados con 30 μM y al grupo testigo; la proporción de espermatozoides capacitados no cambió (Figura 3B, Tabla 3).

EFFECTO DE LA ATRAZINA EN LA CAPACITACIÓN

La viabilidad de los espermatozoides capacitados en presencia de Atrazina, disminuyó significativamente de una manera lineal, lo que concuerda con los datos que se obtuvieron para determinar la CL_{50} .

En poblaciones de espermatozoides expuestos, la capacitación disminuyó significativamente solamente en la concentración 40 μM y llegó a ser el 79% respecto del testigo ($p \leq 0.05$) (Figura 4A, Tabla 4).

En la población espermática expuesta a 8 y 20 μM de Atrazina, la RAE se incrementó significativamente 1.9 veces con respecto al testigo ($p \leq 0.05$) (Figura 4A, Tabla 4). La población de espermatozoides no capacitados se redujo en ambas concentraciones comparadas con el testigo ($p \leq 0.05$). Además, no hubo diferencia

significativa entre los resultados de estas dos concentraciones de Atrazina con respecto al testigo. Los tratamientos con 40 μM incrementaron la RAE, 2.2 veces comparada con el testigo ($p \leq 0.05$) (Figura 4A, Tabla 4).

EFFECTO DE LA ATRAZINA EN LA RAIP

En todas las concentraciones probadas de Atrazina, ésta provocó una disminución significativa en los espermatozoides no capacitados y capacitados ($p \leq 0.05$) comparados con el testigo. Respecto a la RAIP no hubo diferencias entre las concentraciones probadas (Figura 4B, Tabla 5).

Los tratamientos con 8 μM causaron un incremento 1.6 veces en la RAIP ($p \leq 0.05$) comparada con el testigo; este incremento fue el resultado de una disminución en los espermatozoides no capacitados y capacitados.

Los tratamientos con 20 μM y 40 μM incrementaron 1.8 veces la RAIP con respecto al testigo ($p \leq 0.05$) (Figura 4B, Tabla 5).

Tabla 2. Efecto del Fenoxaprop-etil en la Capacitación (4h) de espermatozoides de cerdo (% $\pm$ D.S.), n=5.

μ M	No capacitados	Capacitados	Reaccionados	Viabilidad
0	31 $\pm$ 9	52 $\pm$ 5	17 $\pm$ 9	75 $\pm$ 5
12	29 $\pm$ 9	44 $\pm$ 4	27 $\pm$ 6	64 $\pm$ 4
30	15 $\pm$ 3	46 $\pm$ 3	39 $\pm$ 5	46 $\pm$ 4
60	8 $\pm$ 2	60 $\pm$ 2	32 $\pm$ 2	32 $\pm$ 6

Tabla 3. Efecto del Fenoxaprop-etil en la RAIP de espermatozoides de cerdo, (% $\pm$ D.S.), n=5.

μ M	No capacitados	Capacitados	Reaccionados	Viabilidad
0	32 $\pm$ 1	38 $\pm$ 9	30 $\pm$ 8	72 $\pm$ 5
12	31 $\pm$ 4	42 $\pm$ 6	27 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5
30	22 $\pm$ 4	32 $\pm$ 4	46 $\pm$ 6	47 $\pm$ 4
60	8 $\pm$ 4	33 $\pm$ 1	59 $\pm$ 6	30 $\pm$ 3

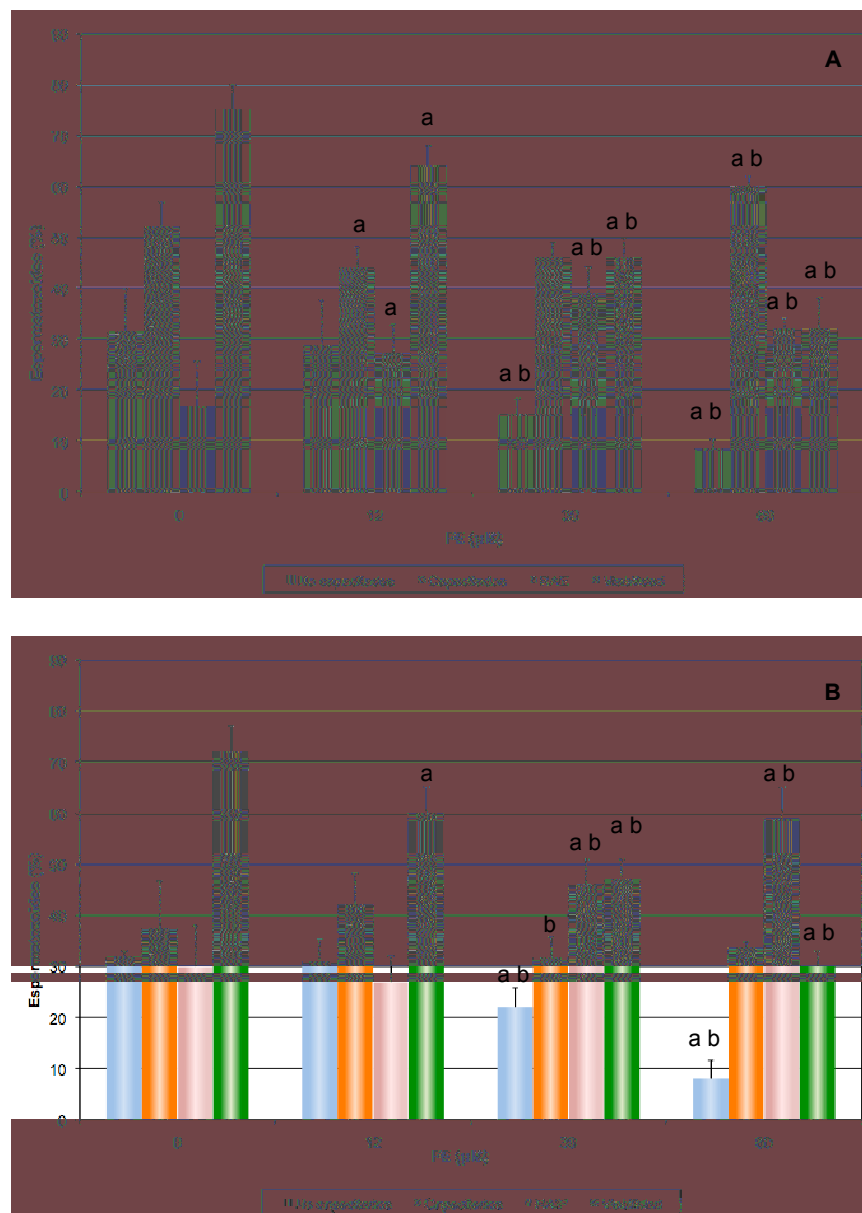


Figura 3. Análisis de espermatozoides capacitados de cerdo (A) 4 horas de incubación y cuya reacción acrosomal no fue inducida sino espontánea (RAE), en presencia de Fenoxaprop-etil (FE). (B) Espermatozoides de cerdo con 4 horas y media de incubación, y con reacción acrosomal inducida por progesterona (RAIP), en presencia de Fenoxaprop-etil (FE). Doscientos espermatozoides fueron contados en cada tratamiento y el resultado son las medias $\pm$ SD (n = 5). Diferencias significativas: **a** VS testigo (0 μ M); **b** VS la concentración siguiente más baja.

Tabla 4. Efecto de la Atrazina en la Capacitación (4 h) de espermatozoides de cerdo (% $\pm$ D.S.), n=5.

μ M	No capacitados	Capacitados	Reaccionados	Viabilidad
0	31 $\pm$ 2	52 $\pm$ 4	17 $\pm$ 4	73 $\pm$ 2
8	22 $\pm$ 6	46 $\pm$ 2	32 $\pm$ 4	58 $\pm$ 3
20	21 $\pm$ 3	47 $\pm$ 5	32 $\pm$ 3	46 $\pm$ 3
40	22 $\pm$ 4	41 $\pm$ 4	37 $\pm$ 3	37 $\pm$ 2

Tabla 5. Efecto de la Atrazina en la RAIP de espermatozoides de cerdo (% $\pm$ D.S.), n=5.

μ M	No capacitado	Capacitados	Reaccionados	Viabilidad
0	32 $\pm$ 1	38 $\pm$ 9	30 $\pm$ 8	71 $\pm$ 1
8	26 $\pm$ 4	25 $\pm$ 6	49 $\pm$ 2	54 $\pm$ 5
20	21 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4	53 $\pm$ 1	45 $\pm$ 3
40	22 $\pm$ 4	25 $\pm$ 1	53 $\pm$ 4	30 $\pm$ 1

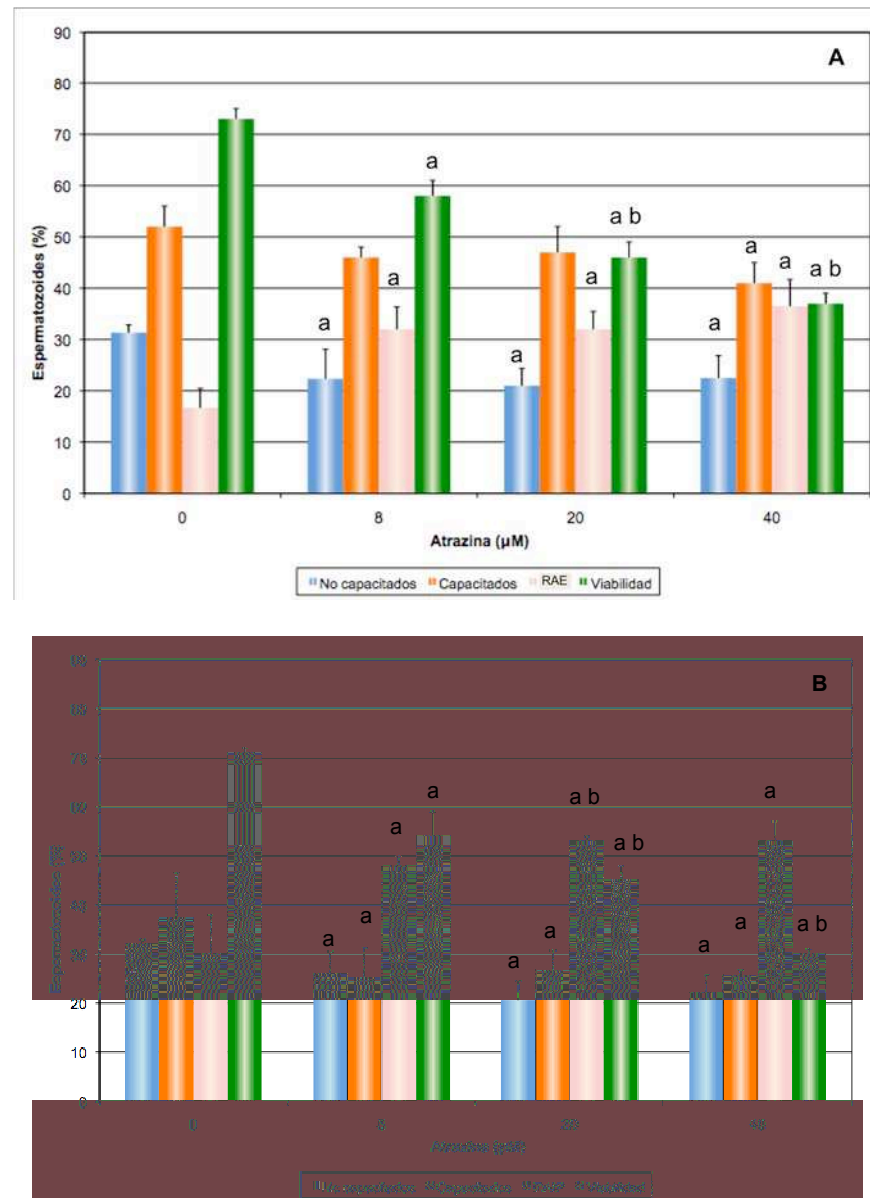


Figura 4. Análisis de espermatozoides capacitados de cerdo **(A)**, 4 horas de incubación y cuya reacción acrosomal no fue inducida sino espontánea (RAE), en presencia de Atrazina. **(B)** Espermatozoides de cerdo con 4 horas y media de incubación, y con reacción acrosomal inducida por progesterona (RAIP), en presencia de Atrazina. Doscientos espermatozoides fueron contados en cada tratamiento y el resultado son las medias $\pm$ SD ($n = 5$). Diferencias significativas: **a** VS testigo (0 μ M); **b** VS la concentración siguiente más baja.

ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Al comparar las electroforesis de las proteínas de los espermatozoides no capacitados y capacitados se encontró lo siguiente: En los espermatozoide no capacitados se apreciaron 20 bandas cuyas masas relativas oscilaron entre 94 kDa y 13 kDa, mientras que en los capacitados sólo se expresaron 15 bandas cuyas masas relativas oscilaron entre 90 kDa y 13 kDa (Figura 5).

De estas 15 bandas, 11 son diferentes a las que aparecen en los no capacitados (90, 85, 80, 73, 67, 58, 54, 51, 26, 18, 16 kDa). Las bandas peptídicas que no sufrieron modificaciones por encontrarse tanto en los espermatozoides no capacitados como en los capacitados son 41, 34, 30 y 13 kDa (Tabla 2), las cuales a pesar de ser ligeramente diferentes en los capacitados, podemos decir que las masas relativas de ambos grupos de bandas son equivalentes.

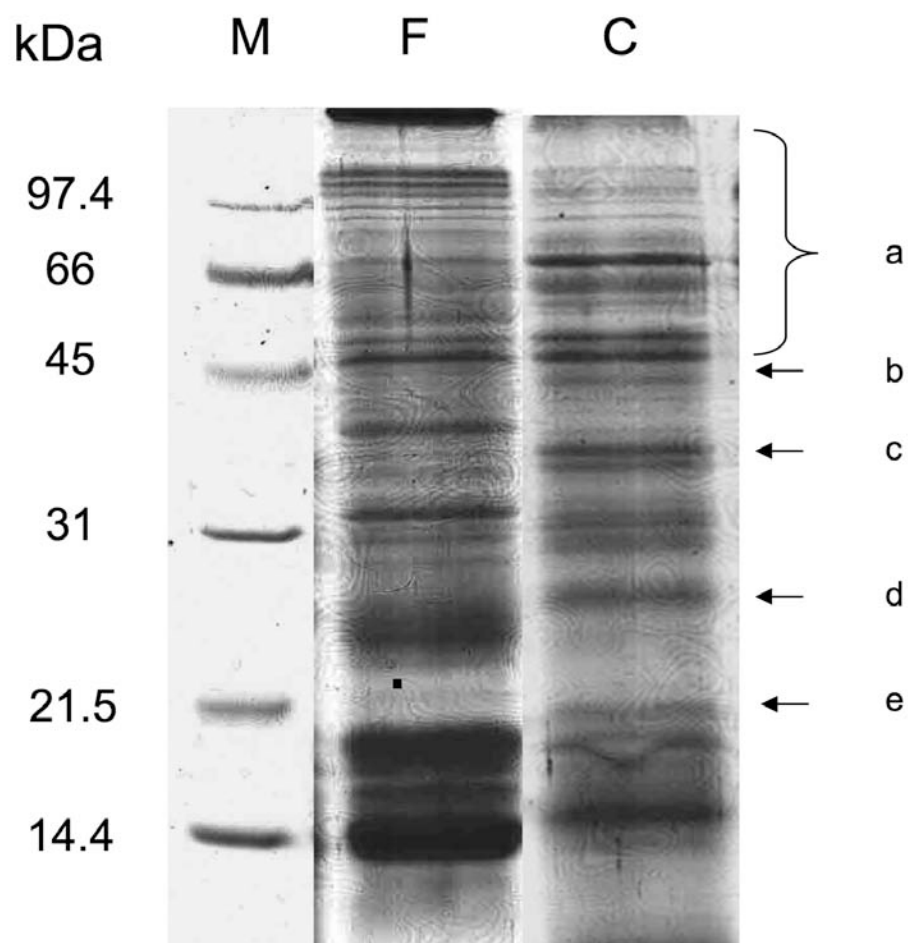


Figura 5. SDS-PAGE de Proteínas solubles totales de Espermatozoides de Cerdo. M. Marcador de peso molecular; F. No capacitados; C. Capacitados; a. Región en donde los capacitados expresan bandas de 90, 85, 80, 73, 67, 58, 54, 51 kDa. b. 41 kDa; c. 34 kDa; d. 26 kDa; e. 18 kDa..

En los espermatozoides capacitados tratados con Atrazina, se expresaron 11 bandas cuyas masas relativas oscilaron entre 86 kDa y 13 kDa. En los espermatozoides capacitados sin tratamiento (grupo testigo) hay bandas que con el tratamiento desaparecen, las cuales son: 85, 67, 58, 51, 26 y 18 kDa. Hay bandas de proteínas que aparecen en espermatozoides tratados con Atrazina durante el proceso de capacitación, pero que presentan ligeros cambios en la masa molecular solamente un poco mayores a los que consideramos variaciones normales en la movilidad electroforética; en espermatozoides capacitados está presente la banda de 90 kDa que se considera que en espermatozoides tratados con el herbicida corresponde a la de 86 kDa, la de 80 a 79, la de 73 a 69, la de 54 a 53, la de 51 a la de 50, la de 41 a 38, y la de 34 a 33 kDa. Las bandas peptídicas que no sufrieron modificaciones por encontrarse tanto en los espermatozoides tratados como en el grupo testigo son 30, 16 y 13 kDa (Figura 6, Tabla 2). La banda de 48 kDa aparece en los tratados con Atrazina pero no en el grupo testigo (capacitados sin tratamiento), ni en los no capacitados. Algunas bandas no desaparecen, sólo cambian su densidad relativa.

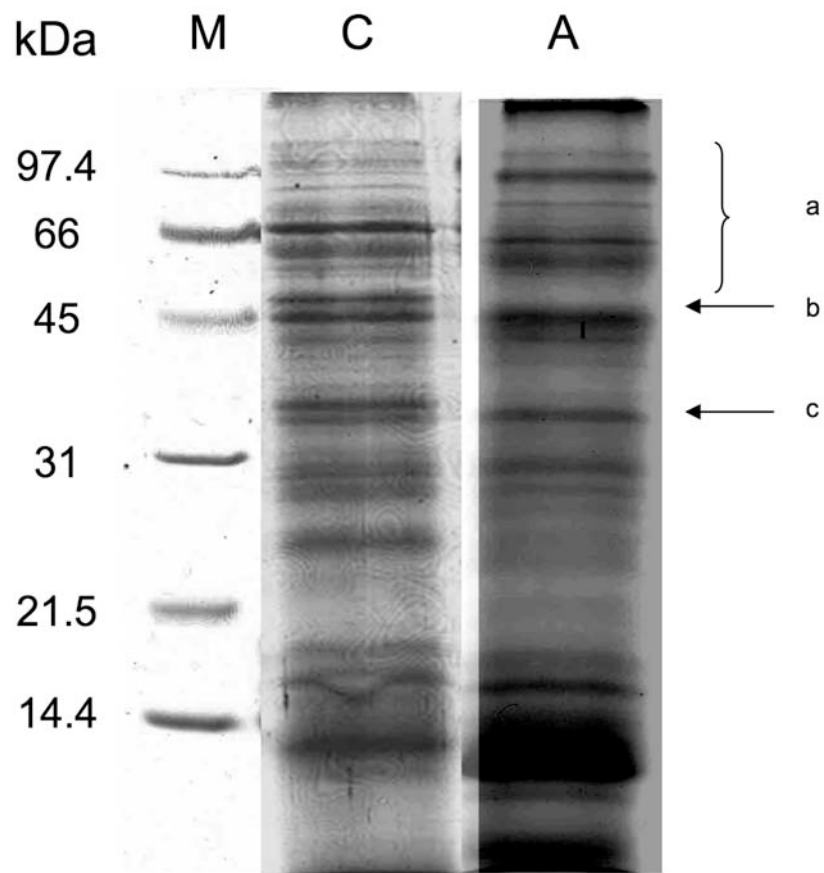


Figura 6. SDS-PAGE de Proteínas solubles totales de Espermatozoides de Cerdo. M. Marcador de peso molecular; C. Capacitados; A. Atrazina; a. Región de los capacitados con Atrazina que expresan bandas de 86, 79, 69, 53, 50 kDa; b. 48 kDa; c. 38 kDa.

En los espermatozoides capacitados tratados con FE aparecen 13 bandas cuyas masas relativas oscilaron entre 94 kDa y 13 kDa. En los espermatozoides del grupo testigo hay bandas que con el tratamiento desaparecen, las cuales son: 85, 54, 51, 41, 26 y 18 kDa. Hay bandas de proteínas que aparecen en espermatozoides tratados con FE durante el proceso de capacitación, pero que presentan ligeros cambios en la masa molecular solamente un poco mayores a los que consideramos variaciones normales en la movilidad electroforética; en espermatozoides capacitados aparece la banda de 90 kDa que se considera que en espermatozoides tratados con el herbicida corresponde a la de 87 kDa, la de 80 a 78, la de 67 a 64, y la de 30 a 28 kDa. Las bandas peptídicas que no sufrieron modificaciones por encontrarse tanto en los espermatozoides tratados como en el grupo testigo son: 73, 58, 34 y 13 kDa. La banda de 37 kDa aparece en los tratados con FE pero no en el grupo testigo (capacitados sin tratamiento), ni en los no capacitados. También se encontraron bandas que en el grupo testigo desaparecen y que en los tratados se encuentran presentes al igual que en los no capacitados, las cuales son: 94, 44, 17 y 15 kDa (Figura 7).

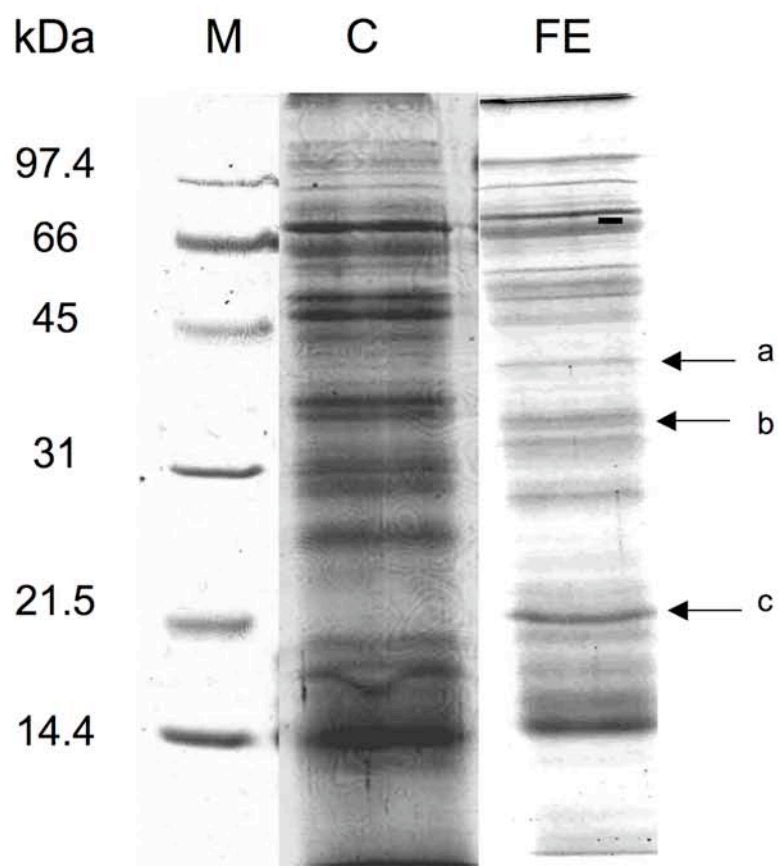


Figura 7. SDS-PAGE de Proteínas solubles totales de Espermatozoides de Cerdo. M. Marcador de peso molecular. C. Capacitados; FE. Fenoxaprop-etil; a. Banda de 37 kDa que no aparece en testigo; b. 34 kDa; c. 28 kDa muy expresada.

**Tabla 6. Análisis de las bandas de proteínas de espermatozoides de cerdo
obtenidas por SDS-PAGE.**

Peso Molecular	No Capacitados	Capacitados (Testigo)	Capacitados-Fenoxaprop-etil	Capacitados-Atrazina
97	94		94	
	92	90		
	89		87	
		85		86
	84			
	81	80		79
	78	73	78	
			73	
	72			
				69
	68	67		
66			64	
	62	58	58	
	57			
	54	54		53
		51		
				50
45				48
	44		44	
	41	41		
				38
			37	
	34	34	34	33
	32			
31				
	30	30		30
			28	
		26		
	25			
21		18		
	17		17	
		16		16
	15		15	
14				
	13	13	13	13

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron los efectos *in vitro* de los herbicidas Atrazina y FE en la capacitación y la reacción acrosomal inducida (RAIP). Todas las concentraciones empleadas fueron subletales ($CL_{5/50}$, $CL_{2/50}$ y CL_{50}) para espermatozoides *in vitro*, usando la CL_{50} como un máximo. El contacto natural con los herbicidas es generalmente una exposición crónica debida a las condiciones laborales. En este estudio, se usaron concentraciones agudas que produjeron daño a los espermatozoides. Dichas concentraciones no son relevantes desde el punto de vista ambiental pero pueden ayudarnos a conocer los mecanismos que dañan al espermatozoide. Los valores que se obtuvieron en este estudio, fueron superiores a las encontradas en el ambiente, ya que en un estudio en USA reporta que en 1998 la concentración de Atrazina en el agua fue de 18.9 ppb, y en el aire $0.32 \mu\text{g}/\text{m}^3$. En otro estudio llevado al cabo en una población rural de Missouri, se encontró una media de $0.17 \mu\text{g}/\text{g}$ de creatinina y en la ciudad de Minnesota fue de $0.07 \mu\text{g}/\text{g}$ (Services, 2003).

De los compuestos probados, la Atrazina fue ligeramente más tóxico que el FE, ya que su LC_{50} fue menor, es decir, a bajas concentraciones llega a matar el 50% de la población.

Ambos herbicidas son compuestos espermatotóxicos ya que afectaron la viabilidad de manera dosis dependiente. Este resultado coincide con los resultados obtenidos por Betancourt *et al.* (2006), quienes encontraron que después de una hora de incubación con $50 \mu\text{M}$ de FE o de Atrazina, la viabilidad disminuyó hasta un 13 y 24 %, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados

anteriormente por Campagna *et al.* (2002), quienes encontraron que la movilidad se reduce de manera dosis dependiente al tratar a los espermatozoides con insecticidas organoclorados. Este efecto en la calidad espermática podría disminuir la fertilidad de los espermatozoides.

La RAE observada en los espermatozoides testigo, inmediatamente después de la capacitación, fue de 17%, mientras que después de 30 minutos de inducción de la RA con la progesterona, ésta se incrementó hasta 30%. Esta diferencia significativa muestra que la progesterona actuó como un inductor de la RA. Nuestro sistema es adecuado para estudiar la acción estimulante o inhibidora de los compuestos en el proceso de la capacitación y RA *in vitro*. Los datos de la capacitación y RA mostrados en este estudio son congruentes con los resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio y por otros autores (He *et al.*, 2001; Jimenez *et al.*, 2006). Los valores de la RAIP son similares a los reportados por otros autores (Berger, 1990; Cheng *et al.*, 1998; Conejo-Nava *et al.*, 2003; Jimenez *et al.*, 2002; Therien y Manjunath, 2003).

Con 12 μ M de concentración de FE, la proporción de espermatozoides capacitados disminuyó significativamente comparada con los testigos, mientras que la proporción de espermatozoides no capacitados no tuvo cambios. La disminución corresponde a un incremento de los espermatozoides que desarrollaron RAE .

A 30 μ M de concentración de FE, la proporción de espermatozoides capacitados no disminuyó significativamente porque simultáneamente los no capacitados alcanzaron el estatus de capacitados, generando una proporción de espermatozoides igual que a la de 12 μ M. La cantidad de espermatozoides que

alcanzaron la RAE se incrementó dramáticamente con respecto al testigo, debido a que las células capacitadas realizaron la reacción acrosomal. Esto indica que el FE para esta concentración induce la RA, pero no la capacitación

Los tratamientos con FE a 60 μ M incrementaron la proporción de espermatozoides capacitados con respecto a los testigos y para las dos concentraciones menores a ésta, la proporción de los no capacitados disminuyó. Sin embargo, la proporción de espermatozoides con estatus RAE se redujo significativamente comparada con la alcanzada con 30 μ M, pero se incrementó con respecto al testigo. Estos resultados indican que la concentración de 60 μ M induce fuertemente la capacitación y la RAE pero que muchas células quedan detenidas en el proceso de capacitación.

El FE a una concentración de 60 μ M induce la capacitación y la RAE en todas las concentraciones probadas. La progesterona y el FE a 30 y 60 μ M incrementaron la RAIP significativamente con respecto al testigo. La concentración más alta de FE duplicó el valor de RAIP y fue significativamente diferente con respecto a 30 μ M. El análisis de los datos nos sugieren que el FE induce la capacitación y prepara a las células para que realicen la RA. Encontramos la mayor proporción de espermatozoides reaccionados después de 4 y 4.5 horas de incubación, lo cual sugiere que altas concentraciones de FE reducen el tiempo de capacitación. Esto puede deberse a que hay un efecto sinérgico entre el FE y la progesterona, que ocasiona un aumento notable en la inducción de la RA.

La capacitación disminuyó significativamente en poblaciones de espermatozoides expuestas a 40 μ M de Atrazina, y al adicionar la progesterona, la

población de espermatozoides capacitados disminuyó significativamente en todas las concentraciones probadas. Este efecto puede deberse a que la Atrazina es un disruptor endócrino que ocupa receptores e impide que se realice la capacitación; al agregar la progesterona, aparentemente disminuye la capacitación pero en realidad lo que sucede es que aumenta el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

En los espermatozoides expuestos a la Atrazina, la RAE y la RAIP se incrementaron con respecto al testigo. Este incremento fue el resultado de dos eventos simultáneos, por una parte la reducción en la población de espermatozoides no capacitados que pasaron al estatus de capacitados, y al incremento de los espermatozoides que estaban capacitados y que pasaron al estatus de reaccionados.

Estos resultados sugieren que la Atrazina tiene un efecto sinérgico en la progesterona, pero no en una manera dosis dependiente debido a que los datos revelan un comportamiento asintótico. Dicho comportamiento también fue reportado en un estudio de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos tratados *in vitro* con el herbicida ametrina con la participación del metabolismo vegetal (Flores-Maya *et al.*, 2005). A pesar de que en los espermatozoides no podemos decir que influye el metabolismo, dicho estudio sirve como referencia del efecto del herbicida en cuanto a un comportamiento asintótico.

Recientemente se encontró (Rago *et al.*, 2007) que los espermatozoides porcinos eyaculados expresan aromatasa así como receptores para andrógenos y estrógenos con localizaciones intracelulares diferentes. Roberge y colaboradores (2004) demostraron que la Atrazina no tiene afinidad para receptores de andrógenos ni estrógenos, pero que es un inhibidor competitivo de las fosfodiesterasas

incrementando el AMPc, que da como resultado una elevada transcripción del gen para la aromatasa humana, lo cual aumenta la actividad de la aromatasa y la subsecuente producción de estrógenos. Aunque este mecanismo es consistente con los efectos de desmasculinización y feminización de la Atrazina, algunos estudios sugieren que la Atrazina no induce la producción de aromatasa en algunas especies y/o en ciertas líneas celulares (Heneweer *et al.*, 2004). Sin embargo, recientemente se demostró que la Atrazina induce la expresión del gen de la aromatasa humana vía el promotor II (ArPII) de manera dependiente del factor 1 esteroideogénico (SF-1), uniéndose directamente al SF-1, incrementando concomitantemente la interacción de SF-1 con el coactivador TIF2, y aumentando más la unión de SF-1 a la cromatina ArPII (Fan *et al.*, 2007). Es muy probable que los efectos en los espermatozoides no son genómicos porque no hay transcripción ni traducción de la información del núcleo, pero recientemente un reporte mostró que el tratamiento con Atrazina disminuyó significativamente el contenido total de lípidos, colesterol y fosfolípidos, causando inhibición significativa de la actividad de la acetilcolinesterasa y la inducción de estrés oxidante de las membranas de los eritrocitos (Singh *et al.*, 2008). Esto indica que uno o más de estos procesos pudieron ocurrir en la membrana de los espermatozoides, afectando su fisiología y su poder fertilizante; es importante continuar haciendo estudios para conocer más etapas de los mecanismos de acción de los herbicidas estudiados.

La RA fue afectada por ambos herbicidas, con un incremento significativo en el número de espermatozoides que sufrieron la RA. Estos resultados sugieren que la capacitación puede completarse en menos tiempo que el normal y la RA puede ser inducida prematuramente. Esto es nocivo pues el espermatozoide debe llevar al cabo

la reacción acrosomal solamente al estar en contacto con las células cúmulo y la zona pelúcida del óvulo y no antes, pues esto daría como resultado ruptura de membranas y muerte del espermatozoide sin haber fertilizado. Será necesario realizar más investigaciones *in vitro* para esclarecer el modo de acción por el cual los herbicidas dañan a los espermatozoides.

Durante la capacitación, ocurren muchas modificaciones bioquímicas en la superficie de la membrana, como la remoción de glicoproteínas periféricas, la redistribución de glicoproteínas integrales, la fosforilación proteínica, pérdida de colesterol y potasio, y entrada de bicarbonato y calcio. Estas modificaciones inducen la activación de receptores y de la adenilciclase dependiente de bicarbonato, así como la hiperpolarización de la membrana. Estos eventos suceden después de la exposición del espermatozoide al tracto genital de la hembra, haciendo que los espermatozoides sean capaces de realizar la RA.

Patrat y colaboradores (2002) encontraron que la progesterona promueve la RA en una subpoblación de espermatozoides mediante el incremento del número de células hiperpolarizadas después de una fase transitoria de despolarización y ejerce sus efectos vía receptores en los espermatozoides (Rago *et al.*, 2007). La familia de los compuestos ácido arilfenoxialcanoico (incluyendo FE) también produce despolarización de potenciales de membrana (Dotray *et al.*, 1993) por lo tanto pensamos que la capacitación se ve afectada por FE y Atrazina debido a la desestabilización del potencial de la membrana de los espermatozoides.

De manera similar, algunos pesticidas organoclorados, como DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), inducen cambios subletales en el potencial transmembranal y en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células del oviducto

bovino (Tiemann *et al.*, 1998). La membrana plasmática del gameto masculino es rica en lípidos poli-insaturados, los cuales son sensibles al estrés oxidante que generan las ROS (Aitken *et al.*, 1997; Sanocka y Kurpysz, 2004).

También las ROS producidas por NADPH oxidasa pueden ser convertidas en radicales hidropéroxidos (-OOH) que inician una cascada de peroxidación, afectando los lípidos de membrana y causando desestabilización de la membrana plasmática (Bielski *et al.*, 1983; Storey, 1997). Una ligera peroxidación es requerida para inducir la capacitación *in vitro* (Asquith *et al.*, 2004; Flesch y Gadella, 2000), sin embargo, una peroxidación excesiva daña la célula (Aitken *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2004; Bonarska *et al.*, 2002a; Bonarska *et al.*, 2002b; Leclerc *et al.*, 1998).

En el presente estudio se encontró que algunas bandas corresponden exactamente a la masa molecular de las bandas de proteínas de espermatozoides tratados con los herbicidas, es decir, no hubo efecto. En otros casos, las proteínas correspondientes se modificaron y perdieron algún componente de su estructura transformándose en otro compuesto peptídico de menor o mayor masa molecular, esto podría estar indicando que cambia su concentración; mediante el análisis visual complementado con el análisis matemático se puede determinar si se trata aproximadamente de la misma proteína considerando que las variaciones son un poco mayores a los que consideramos variaciones normales en la movilidad electroforética pero no tan grandes como para considerar que se trate de otra proteína.

Cabe mencionar que se observó que en los geles correspondientes al tratamiento con Atrazina, las bandas se ven menos definidas que las del tratamiento con FE; esto podría estar relacionado con el hecho de que la Atrazina ocasione

liberación de enzimas proteolíticas que degradan a las proteínas en un cierto grado y por ese motivo es que se ven menos definidas. Además, estos resultados concuerdan con el hecho de que la LC_{50} de Atrazina fue más baja que la de FE, es decir, a bajas concentraciones llega a matar el 50% de la población, denotando mayor toxicidad.

Resulta interesante observar que hay proteínas que no sufren ninguna modificación con ambos herbicidas como la de 13 kDa; otras proteínas desaparecen con los tratamientos como las de 18, 26, 51 y 85 kDa; también las de 15, 17, 44 y 94 kDa que deberían desaparecer en los capacitados y que siguen presentes; es importante continuar con estos estudios y determinar qué proteínas son, porque están siendo o no afectadas, y cuál es su función en el reconocimiento con el óvulo y en el proceso de fertilización.

Una causa probable de la alteración de la capacitación y RA es la afectación de la membrana plasmática y cambios en el potencial de membrana; estos pueden deberse a que se inicia una cascada de peroxidación lipídica de la membrana debida directamente a la presencia de los herbicidas. Este exceso de lipoperoxidación podría explicar también la pérdida de la movilidad y la viabilidad en los espermatozoides tratados. Si bien es cierto que una peroxidación ligera induce la capacitación *in vitro*, una peroxidación excesiva daña la membrana celular alterando, en el caso de los espermatozoides, la capacitación y la RA como lo muestran nuestros resultados. Esto también podría explicar las diferencias en el patrón electroforético de las proteínas solubles totales de espermatozoides tratados y testigo, ya que en una membrana dañada, la movilidad de las proteínas y la formación y ensamblaje de las balsas lipídicas pueden estar alterados.

Este trabajo debe continuarse en tres vertientes: Una en la que se realicen estudios para secuenciar e identificar las proteínas que se vieron afectadas por los herbicidas y con ello poder postular la función de la proteína, así como el mecanismo de acción del herbicida. La segunda, es verificar si el fenoxaprop-etil puede penetrar al espermatozoide, afectando la fosforilación de las proteínas espermáticas, si actúa incorporándose a la membrana, modificando la fluidez y desestabilizándola, o si solamente tiene un efecto evitando la remoción de colesterol del espermatozoide. La tercera sería cuantificar la lipoperoxidación en la membrana plasmática y en la de la mitocondria en espermatozoides tratados y sin tratamiento, y en su caso, determinar por qué cambia el grado de peroxidación.

CONCLUSIONES

La CL₅₀ para FE es de 60 μ M y para Atrazina de 40 μ M. La viabilidad de los espermatozoides se vio afectada de manera dependiente de la concentración con ambos herbicidas.

El FE indujo la capacitación a 60 μ M e indujo la RAE con todas las concentraciones estudiadas. Los espermatozoides expuestos a la Atrazina, tuvieron un descenso en la capacitación mientras que la RAE y RAIP se incrementaron significativamente en todas las concentraciones probadas.

El FE y la Atrazina incrementaron notablemente la RAIP, denotando un efecto sinérgico con la progesterona. El efecto del FE es dosis dependiente mientras que el de la atrazina presentó un comportamiento asintótico.

En el estudio bioquímico se encontró que el tratamiento con Atrazina provocó la desaparición de las bandas de 85, 67, 58, 51, 26 y 18 kDa. La banda de 48 kDa aparece en los espermatozoides tratados pero no en el grupo testigo (capacitados sin tratamiento), esto indica que de alguna manera la atrazina impidió la pérdida de dicha proteína, lo cual podría impedir la fertilización.

El tratamiento de FE provocó la desaparición de las bandas de 85, 54, 51, 41, 26 y 18 kDa. La banda de 37 kDa aparece en los tratados con FE pero no en el grupo testigo, ni en los no capacitados. Las bandas de 94, 44, 17 y 15 kDa, que debían desaparecer durante la capacitación, en los tratados con FE, se encuentran presentes al igual que en los no capacitados (tiempo cero de incubación).

El FE y la Atrazina alteran el proceso de capacitación y reacción acrosomal, lo que se ve reflejado en el porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados, así como en las diferencias entre los patrones electroforéticos respectivos.

REFERENCIAS

- Adeoya-Osiguwa, S.A., Dudley, R.K., Hosseini, R., Fraser, L.R.** 1998. FPP modulates mammalian sperm function via TCP-11 and the adenylyl cyclase/cAMP pathway. *Mol Reprod Dev* **51**:468-76.
- Ain, R., Uma Devi, K., Shivaji, S., Seshagiri, P.B.** 1999. Pentoxifylline-stimulated capacitation and acrosome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signalling molecules. *Mol Hum Reprod* **5**:618-26.
- Aitken, R.J., Fisher, H.M., Fulton, N., Gomez, E., Knox, W., Lewis, B., Irvine, S.** 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* **47**:468-82.
- Arnoult, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R., Florman, H.M.** 1996. Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:13004-9.
- Asquith, K.L., Baleato, R.M., McLaughlin, E.A., Nixon, B., Aitken, R.J.** 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci* **117**:3645-57.
- Bailey, J.L., Storey, B.T.** 1994. Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol Reprod Dev* **39**:297-308.

- Baker, S.S., Thomas, M., Thaler, C.D.** 2004. Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *J Androl* **25**:744-751.
- Barberá, C.** 1989. *Pesticidas Agrícolas*, 4a. ed. Omega, Barcelona.
- Berger, B.M.** 1999. Factors influencing transformation rates and formation of products of phenylurea herbicides in soil. *J Agric Food Chem* **47**:3389-96.
- Berger, T.** 1990. *Pisum sativum* agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology* **33**:689-695.
- Betancourt, M., Resendiz, A., Fierro, E.C.** 2006. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) *in vitro*. *Reprod Toxicol* **22**:508-12.
- Bielski, B.H., Arudi, R.L., Sutherland, M.W.** 1983. A study of the reactivity of $\text{HO}_2/\text{O}^{2-}$ with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **258**:4759-61.
- Blobel, C.P., Myles, D.G., Primakoff, P., White, J.M.** 1990. Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *J Cell Biol* **111**:69-78.
- Bonarska, D., Kleszczynska, H., Sarapuk, J.** 2002a. Antioxidative activity of some phenoxy and organophosphorous compounds. *Cell Mol Biol Lett* **7**:929-935.
- Bonarska, D., Kleszczynska, H., Sarapuk, J.** 2002b. The oxidative activity of some organophosphorous compounds. *Cell Mol Biol Lett* **7**:279.
- Bonilla, E., Amador, A., Betancourt, M.** 1994. *In vitro* capacitation of boar sperm in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine. *Med Sci Res* **22**:725 - 726.

- Brandelli, A., Miranda, P.V., Tezon, J.G.** 1996. Voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetylglucosaminy/mannosyl neoglycoproteins. *J Androl* **17**:522-9.
- Campagna, C., Guillemette, C., Paradis, R., Sirard, M.A., Ayotte, P., Bailey, J.L.** 2002. An environmentally relevant organochlorine mixture impairs sperm function and embryo development in the porcine model. *Biol Reprod* **67**:80-7.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E.** 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305**:609-13.
- Chapin, R.E., Stevens, J.T., Hughes, C.L., Kelce, W.R., Hess, R.A., Daston, G.P.** 1996. Endocrine modulation of reproduction. *Fundam Appl Toxicol* **29**:1-17.
- Cheng, F.P., Gadella, B.M., Voorhout, W.F., Fazeli, A., Bevers, M.M., Colenbrander, B.** 1998. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod* **59**:733-42.
- Chiang, H.C., Yen, J.H., Wang, Y.S.** 1997. Sorption of herbicides butachlor, thiobencarb, and chlomethoxyfen in soils. *Bull Environ Contam Toxicol* **58**:758-63.
- Conejo-Nava, J., Fierro, R., Gutierrez, C.G., Betancourt, M.** 2003. Membrane status and *in vitro* capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Arch Androl* **49**:287-295.
- Cooper, R.L., Goldman, J.M., Stoker, T.E.** 1999. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. *Toxicol and Health* **15**:26-36.

- Cooper, R.L., Stoker, T.E., Goldman, J.M., Parrish, M.B., Tyrey, L.** 1996. Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reproductive Toxicology* **10**:257-264.
- Cooper, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Goldman, J.M., McElroy, W.K.** 2000. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci* **53**:297-307.
- Cross, N.L., Razy-Faulkner, P.** 1997. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod* **56**:1169-74.
- Cummings, A.M., Rhodes, B.E., Cooper, R.L.** 2000a. Atrazine effects on early pregnancy and implantation in the rat. *Biology of Reproduction* **62**:183-184.
- Cummings, A.M., Rhodes, B.E., Cooper, R.L.** 2000b. Effect of atrazine on implantation and early pregnancy in 4 strains of rats. *Toxicol Sci* **58**:135-43.
- Donaldson, D., Kiely, T., A., G.** 2002. Pesticides Industry Sales and Usage Report. U.S. Environmental Protection Agency.
- Dotray, P.A., Ditomaso, J.M., Gronwald, J.W., Wyse, D.L., Kochian, L.V.** 1993. Effects of acetyl-coenzyme-a carboxylase inhibitors on root cell transmembrane electric potentials in graminicide-tolerant and graminicide-susceptible corn (*Zea mays* L). *Plant Physiol* **103**:919-924.
- Ecobichon, D.F., Joy, R.** 1984. Pesticides and neurological diseases. C.R.C. Press, Boca-Ratón, Florida.
- Eldridge, J.C., Tennant, M.K., Wetzal, L.T., Breckenridge, C.B., Stevens, J.T.** 1994. Factors affecting mammary tumor incidence in chlorotriazine-treated female rats: hormonal properties, dosage, and animal strain. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 11**:29-36.

- Emiliozzi, C., Fenichel, P.** 1997. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biol Reprod* **56**:674-9.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H.** 2007. Herbicide atrazine activates SF-1 by direct affinity and concomitant co-activators recruitments to induce aromatase expression via promoter II. *Biochem Biophys Res Commun* **355**:1012-8.
- Finney, D.J.** 1978. Statistical method in biological assay., 3rd ed. Charles Griffin & Co. Ltd., London.
- Flesch, F.M., Gadella, B.M.** 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* **1469**:197-235.
- Flesch, F.M., Voorhout, W.F., Colenbrander, B., van Golde, L.M., Gadella, B.M.** 1998. Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod* **59**:1530-9.
- Flores-Maya, S., Gomez-Arroyo, S., Calderon-Segura, M.E., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S.M., de la Cruz, L.G.** 2005. Promutagen activation of triazine herbicides metribuzin and ametryn through *Vicia faba* metabolism inducing sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro* and in *V faba* root tip meristems. *Toxicol in Vitro* **19**:243-251.
- Florman, H.M., Arnoult, C., Kazam, I.G., Li, C., O'Toole, C.M.** 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* **59**:12-6.

- Flowers, W.L.** 1997. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil*:67-78.
- Fraser, L.R.** 1998a. Interactions between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor. *Mol Reprod Dev* **51**:193-202.
- Fraser, L.R.** 1998b. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* **13 Suppl 1**:9-19.
- Fraser, L.R.a.H., J. E.** 1990. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa equieres a suitable. *J Reprod Fertil*:611 - 621.
- Garner, D.L., Hafez, E., S .E.** 1993. Spermatozoa and seminal plasma, p. 165-187. *In* Hafez, E.S.E. (ed.), *Reproduction in Farm Animals*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Giusi, G., Facciolo, R.M., Canonaco, M., Alleva, E., Belloni, V., Dessi'-Fulgheri, F., Santucci, D.** 2006. The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic somatostatinergic neuronal expression pattern in mice. *Toxicol Sci* **89**:257-264.
- Gojmerac, T., Kartal, B., Curic, S., Zuric, M., Kusevic, S., Cvetnic, Z.** 1996. Serum biochemical changes associated with cystic ovarian degeneration in pigs after atrazine treatment. *Toxicol Lett* **85**:9-15.
- Gordon, J.A., Heller, S.K., Kaduce, T.L., Spector, A.A.** 1994. Formation and release of a peroxisome-dependent arachidonic acid metabolite by human skin fibroblasts. *J Biol Chem* **269**:4103-9.

- Grabinska-Sota, E., Kalka, J., Wisniowska, E.** 2000. Biodegradation and genotoxicity of some chemical plant protection products. *Cent Eur J Public Health* **8 Suppl**:93-4.
- Gressel, J.** 1984. Evolution of herbicide-resistant weeds. *Ciba Found Symp* **102**:73-93.
- Harkema, W., Colenbrander, B., Engel, B., Woelders, H.** 2004a. Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during *in vitro* capacitation. *Theriogenology* **61**:215-26.
- Harkema, W., Harrison, R.A., Miller, N.G., Topper, E.K., Woelders, H.** 1998. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of the intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol Reprod* **58**:421-30.
- Harkema, W., Visser, I., Soede, N.M., Kemp, B., Woelders, H.** 2004b. Capacity of boar spermatozoa to bind zona pellucida proteins *in vitro* in relation to fertilization rates *in vivo*. *Theriogenology* **61**:227-38.
- Harrison, R.A., Ashworth, P.J., Miller, N.G.** 1996. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* **45**:378-91.
- He, L., Bailey, J.L., Buhr, M.M.** 2001. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol Reprod* **64**:69-79.
- Heneweer, M., van den Berg, M., Sanderson, J.T.** 2004. A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as *in vitro* screening tools for effects on aromatase. *Toxicol Lett* **146**:183-94.

- Hjorth, M., Mondolot, L., Buatois, B., Andary, C., Rapior, S., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Ravn, H.W.** 2006. An easy and rapid method using microscopy to determine herbicide effects in Poaceae weed species. *Pest Manag Sci* **62**:515-21.
- Holtz, W.V.** 1995. The sperm plasma membrane. Edited by Fenichel, P. Parinaud, J.: EUROTEXT LTD.
- Jensen, L.J., Schmitt, B.M., Berger, U.V., Nsumu, N.N., Boron, W.F., Hediger, M.A., Brown, D., Breton, S.** 1999. Localization of sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein and messenger ribonucleic acid in rat epididymis. *Biol Reprod* **60**:573-9.
- Jimenez, I., Fierro, R., Gonzalez-Marquez, H., Mendoza-Hernandez, G., Romo, S., Betancourt, M.** 2006. Carbohydrate affinity chromatography indicates that arylsulfatase-A from capacitated boar sperm has mannose and N-acetylglucosamine/sialic acid residues. *Arch Androl* **52**:455-62.
- Jimenez, I., Gonzalez-Marquez, H., Ortiz, R., Betancourt, M., Herrera, J., Fierro, R.** 2002. Expression of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boars by flow cytometry. *Arch Androl* **48**:159-66.
- Jimenez, I., Gonzalez-Marquez, H., Ortiz, R., Herrera, J.A., Garcii, A., Betancourt, M., Fierro, R.** 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* **59**:1171-80.
- Jones, R., Mann, T., Sherins, R.** 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* **31**:531-7.

- Jouannet, P., Ducot, B., Feneux, D., Spira, A.** 1988. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl* **11**:379-94.
- Kniewald, J., Jakominic, M., Tomljenovic, A., Simic, B., Romac, P., Vranesic, D., Kniewald, Z.** 2000. Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *J Appl Toxicol* **20**:61-8.
- Knobil, E., and neill, J. D., Eds.** 1994. *The Physiology of Reproduction*. Segunda ed. New York: Raven Press Ltd, New York.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- Lakoski, K., Williams, C., Saling, P.** 1989. Proteins of the acrosomal region in mouse sperm: immunological probes reveal post-testicular modifications. *Gamete Res* **23**:21-37.
- Lassalle, B., Testart, J.** 1994. Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. *J Reprod Fertil* **101**:703-11.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., Gagnon, C.** 1996. Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* **55**:684-92.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., Gagnon, C.** 1998. Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl* **19**:434-43.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-75.

- Lum, L., Blobel, C.P.** 1997. Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. *Dev Biol* **191**:131-45.
- Mann, T., Lutwak-Mann, C.** 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. Springer Verlag., Berlin/Heidelberg/New York.
- Maxwell, W.M., Johnson, L.A.** 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* **46**:408-18.
- Maxwell, W.M., Welch, G.R., Johnson, L.A.** 1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* **8**:1165-78.
- Meyers, S.A., Rosenberger, A.E.** 1999. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol Reprod* **61**:444-51.
- Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Chan, E.K., Schatten, G.** 2000. Vesicular traffic and golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. *Biol Reprod* **63**:89-98.
- Multigner, L., Oliva, A.** 2002. Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad Saude Publica* **18**:403-12.
- Murphy, M.B., Hecker, M., Coady, K.K., Tompsett, A.R., Jones, P.D., Du Preez, L.H., Everson, G.J., Solomon, K.R., Carr, J.A., Smith, E.E., Kendall, R.J., Van Der Kraak, G., Giesy, J.P.** 2006. Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquat Toxicol* **76**:230-45.

- Narotsky, M.G., Best, D.S., Guidici, D.L., Cooper, R.L.** 2001. Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. *Reprod Toxicol* **15**:61-9.
- Nunziata, A.** 1998. Overview of current *in vitro* test procedures to reproductive toxicology., p. 171-183. *In* del Mazo, J. (ed.), *Reproductive Toxicology: In vitro Germ Cell Developmental Toxicology, from Science to Social and Industrial Demand*, vol. 444. Plenum, New York.
- Osheroff, J.E., Visconti, P.E., Valenzuela, J.P., Travis, A.J., Alvarez, J., Kopf, G.S.** 1999. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* **5**:1017-26.
- Parkkila, S., Kaunisto, K., Kellokumpu, S., Rajaniemi, H.** 1991. A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry* **95**:477-82.
- Patrat, C., Serres, C., Jouannet, P.** 2002. Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa. *Biol Reprod* **66**:1775-80.
- Pereira, B.M., Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R.** 1998. Rat sperm surface mannosidase is first expressed on the plasma membrane of testicular germ cells. *Biol Reprod* **59**:1288-95.
- Petruszak, J.A., Nehme, C.L., Bartles, J.R.** 1991. Endoproteolytic cleavage in the extracellular domain of the integral plasma membrane protein CE9 precedes its redistribution from the posterior to the anterior tail of the rat spermatozoon during epididymal maturation. *J Cell Biol* **114**:917-27.

- Phelps, B.M., Koppel, D.E., Primakoff, P., Myles, D.G.** 1990. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J Cell Biol* **111**:1839-47.
- Price, L.J., Herbert, D., Cole, D.J., Harwood, J.L.** 2003. Use of plant cell cultures to study graminicide effects on lipid metabolism. *Phytochemistry* **63**:533-541.
- Proctor, N.H., Casida, J.E.** 1975. Organophosphorus and methyl carbamate insecticide teratogenesis: diminished NAD in chicken embryos. *Science* **190**:580-2.
- Rago, V., Aquila, S., Panza, R., Carpino, A.** 2007. Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. *Reprod Biol Endocrinol* **5**:23.
- Ravanel, P., Liegeois, M.H., Chevallier, D., Tissut, M.** 1999. Soil thin-layer chromatography and pesticide mobility through soil microstructures. New technical approach. *J Chromatogr A* **864**:145-54.
- Rillo, M., Martínez, E., García, C., De Alba, C.** 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reprod Dom Anim* **31**:519-526.
- Roberge, M., Hakk, H., Larsen, G.** 2004. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicol Lett* **154**:61-8.
- Ruiz-Santaella, J.P., Bastida, F., Franco, A.R., De Prado, R.** 2006a. Morphological and molecular characterization of different *Echinochloa* spp. and *Oryza sativa* populations. *J Agric Food Chem* **54**:1166-72.
- Ruiz-Santaella, J.P., Heredia, A., Prado, R.D.** 2006b. Basis of selectivity of cyhalofop-butyl in *Oryza sativa* L. *Planta* **223**:191-9.

- Runnebaum, I.B., Schill, W.B., Topfer-Petersen, E.** 1995. ConA-binding proteins of the sperm surface are conserved through evolution and in sperm maturation. *Andrologia* **27**:81-90.
- Sanocka, D., Kurpisz, M.** 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* **2**:12.
- Schoeny, R.** 1996. Use of genetic toxicology data in U.S. EPA risk assessment: the mercury study report as an example. *Environ Health Perspect* **104 Suppl 3**:663-73.
- Services, U.S.D.o.H.a.H.** 2003. Toxicological profile for atrazine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia
- Simpkins, S.B., Peiffer-Schneider, S., Mutch, D.G., Gersell, D., Goodfellow, P.J.** 1998. PTEN mutations in endometrial cancers with 10q LOH: additional evidence for the involvement of multiple tumor suppressors. *Gynecol Oncol* **71**:391-5.
- Singh, M., Sandhir, R., Kiran, R.** 2008. Atrazine-induced alterations in rat erythrocyte membranes: ameliorating effect of vitamin E
10.1002/jbt.20249. *J Biochem Mol Toxicol* **22**:363-9.
- Singh, N., Dureja, P.** 2000. Persistence of hexaconazole, a triazole fungicide in soils. *J Environ Sci Health B* **35**:549-58.
- Stevens, J.T., Breckenridge, C.B., Wetzel, L.T., Gillis, J.H., Luempert, L.G., 3rd, Eldridge, J.C.** 1994. Hypothesis for mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats exposed to certain triazine herbicides. *J Toxicol Environ Health* **43**:139-53.

- Stevens, J.T., Sumner, D.D.** 1991. Herbicides. San Diego: Academic Press,, San Diego. USA.
- Storey, B.T.** 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **3**:203-213.
- Suzuki, F.** 1990. Morphological aspects of sperm maturation: modification of the sperm plasma membrane during epididymal transport, p. 65-76. *In* Bavister, B.D., Cummins, J., Roldan, E. (ed.), Fertilization in mammals. Serono Symposia, Massachusetts.
- Swan, S.H., Elkin, E.P., Fenster, L.** 2000. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* **108**:961-6.
- Tardif, S., Dube, C., Bailey, J.L.** 2003. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* **68**:207-13.
- Tardif, S., Dube, C., Chevalier, S., Bailey, J.L.** 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* **65**:784-92.
- Therien, I., Manjunath, P.** 2003. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* **69**:1408-15.
- Tiemann, U., Pohland, R., Kuchenmeister, U., Viergutz, T.** 1998. Influence of organochlorine pesticides on transmembrane potential, oxidative activity, and ATP-induced calcium release in cultured bovine oviductal cells. *Reprod Toxicol* **12**:551-7.

- Topfer-Petersen, E.** 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum Reprod Update* **5**:314-29.
- Topfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P.F., Ekhlas-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L., Calvete, J.J.** 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**:217-24.
- Tranter, R., Read, J.A., Jones, R., Brady, R.L.** 2000. Effector sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm beta-acrosin. *Structure* **8**:1179-88.
- Tulsiani, D.R., Abou-Haila, A., Loeser, C.R., Pereira, B.M.** 1998a. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* **240**:151-64.
- Tulsiani, D.R., NagDas, S.K., Skudlarek, M.D., Orgebin-Crist, M.C.** 1995a. Rat sperm plasma membrane mannosidase: localization and evidence for proteolytic processing during epididymal maturation. *Dev Biol* **167**:584-95.
- Tulsiani, D.R., Orgebin-Crist, M.C., Skudlarek, M.D.** 1998b. Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. *J Reprod Fertil Suppl* **53**:85-97.
- Tulsiani, D.R., Skudlarek, M.D., Araki, Y., Orgebin-Crist, M.C.** 1995b. Purification and characterization of two forms of beta-D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein(s). *Biochem J* **305 (Pt 1)**:41-50.
- Tulsiani, D.R., Skudlarek, M.D., Holland, M.K., Orgebin-Crist, M.C.** 1993a. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol Reprod* **48**:417-28.

Tulsiani, D.R., Skudlarek, M.D., Nagdas, S.K., Orgebin-Crist, M.C. 1993b.

Purification and characterization of rat epididymal-fluid alpha-D-mannosidase: similarities to sperm plasma-membrane alpha-D-mannosidase. *Biochem J* **290** (Pt 2):427-36.

Tulsiani, D.R., Yoshida-Komiya, H., Araki, Y. 1997. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod* **57**:487-94.

U.S. Environmental Protection Agency December 26th, 2006. 2007, posting date. Statistical Analysis for Biological Methods. US EPA. [Online.]

Ueda, M., Imai, T., Takizawa, T., Onodera, H., Mitsumori, K., Matsui, T., Hirose, M. 2005. Possible enhancing effects of atrazine on growth of 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Cancer Sci* **96**:19-25.

Vischetti, C., Esposito, A. 1999. Degradation and transformation of a potential natural herbicide in three soils. *J Agric Food Chem* **47**:3901-4.

Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**:1129-37.

Visconti, P.E., Kopf, G.S. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* **59**:1-6.

Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**:1139-50.

- Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Fraser, L.R., Niwa, K.** 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* **104**:305-13.
- Ward, C.R., Storey, B.T., Kopf, G.S.** 1992. Activation of a Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem* **267**:14061-7.
- Ward, C.R., Storey, B.T., Kopf, G.S.** 1994. Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem* **269**:13254-8.
- Wetzel, L.T., Luempert, L.G., Breckenridge, C.B., Tisdell, M.O., Stevens, J.T., Thakur, A.K., Extrom, P.J., Eldridge, J.C.** 1994. Chronic Effects of Atrazine on Estrus and Mammary-Tumor Formation in Female Sprague-Dawley and Fischer-344 Rats. *J Toxicol Environ Health* **43**:169-182.
- Wilhelms, K.W., Cutler, S.A., Proudman, J.A., Anderson, L.L., Scanes, C.G.** 2005. Atrazine and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sexually maturing precocial birds: studies in male Japanese quail. *Toxicol Sci* **86**:152-60.
- Wilhelms, K.W., Cutler, S.A., Proudman, J.A., Anderson, L.L., Scanes, C.G.** 2006a. Effects of atrazine on sexual maturation in female Japanese quail induced by photostimulation or exogenous gonadotropin. *Environ Toxicol Chem* **25**:233-40.
- Wilhelms, K.W., Cutler, S.A., Proudman, J.A., Carsia, R.V., Anderson, L.L., Scanes, C.G.** 2006b. Lack of effects of atrazine on estrogen-responsive

- organs and circulating hormone concentrations in sexually immature female Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Chemosphere* **65**:674-81.
- Wilhelms, K.W., Fitzpatrick, K.F., Scanes, C.G., Anderson, L.L.** 2006c. In ovo exposure to a triazine herbicide: effects of atrazine on circulating reproductive hormones and gonadal histology in young Japanese quail. *Arch Environ Contam Toxicol* **51**:117-22.
- Willingham, E.** 2004. Endocrine-disrupting compounds and mixtures: unexpected dose-response. *Arch Environ Contam Toxicol* **46**:265-9.
- Willingham, E., Rhen, T., Sakata, J.T., Crews, D.** 2000. Embryonic treatment with xenobiotics disrupts steroid hormone profiles in hatchling red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Environ Health Perspect* **108**:329-32.
- Yanagimachi, R.** 1994. Mammalian fertilization, p. 189-318. *In* Knobil, E., Neill, J.D. (ed.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edn ed, vol. 1. Raven Press, New York.
- Zagnitko, O., Jelenska, J., Tevzadze, G., Haselkorn, R., Gornicki, P.** 2001. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6617-22.
- Zaneveld, L.J., De Jonge, C.J., Anderson, R.A., Mack, S.R.** 1991. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* **6**:1265-74.
- Zayas, H., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Casas, E., Cordova, A., Bentacourtr, M.** 1995. Affinity of pig oocyte zona pelucida peptides of sperm proteins. *Med Sci Res* **23**:831- 832.

- Zhang, X.Q., Powles, S.B.** 2006. The molecular bases for resistance to acetyl co-enzyme A carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides in two target-based resistant biotypes of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Planta* **223**:550-557.
- Zinaman, M.J., Clegg, E.D., Brown, C.C., O'Connor, J., Selevan, S.G.** 1996. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* **65**:503-9.