



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ENZIMAS ANTI-ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO, COMO
REGULADORES EN LOS PROCESOS DE ESPERMATOGÉNESIS,
MADURACIÓN Y ALMACENAMIENTO PROLONGADO DE
ESPERMATOZOIDES EN EL MURCIÉLAGO**

Corynorhinus mexicanus.

T E S I S

Q U E P R E S E N T A:

M. en B. E. EDITH ARENAS RÍOS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR: DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA

ASESOR: DR. RICARDO LÓPEZ WILCHIS

ASESOR: DR. EFRAÍN MERCADO PICHARDO

MÉXICO, DF

NOVIEMBRE 2009

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

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

EDITH ARENAS RÍOS

El día 29 de noviembre del año de 2009

Jurado:

Tutor: **Dr. Adolfo Rosado García**

Asesor: **Dr. Ricardo López Wilchis**

Asesor: **Dr. Efraín Mercado Pichardo**

Sinodal: **Dra. Gisela Fuentes Mascorro**

Sinodal: **Dr. Miguel Ángel León Galván**

RESUMEN

En el presente estudio se determinó: 1° la generación de ERO en espermatozoides y fluido epididimarios del murciélago *Corynorhinus mexicanus* en la etapa de maduración epididimaria y de almacenamiento espermático, 2° los niveles de lipoperoxidación, así como, la participación del fluido epidídimo de este murciélago como inhibidor de la lipoperoxidación usando espermatozoides lavados de epidídimo de murciélago y espermatozoides lavados de eyaculado de cerdo (como control), y 3° determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX en testículo y diferencialmente en fluido y en los espermatozoides aislados de cabeza y cola del epidídimo; con el objetivo de estudiar la relación que existe entre la actividad de estas enzimas antioxidantes, los niveles de lipoperoxidación y la generación de ERO en este modelo de estudio. El patrón observado en el murciélago presenta un solo ciclo reproductivo anual con una asincronía temporal entre las funciones reproductivas primarias y las secundarias. El primer registro de espermatozoides en el epidídimo se observó a finales del mes de agosto, y se continuó hasta finales de octubre (última fecha de registro). En la producción de ERO se observa la siguiente tendencia: espermatozoides de cerdo > espermatozoides de murciélago cabeza > espermatozoides de murciélago cola, y la producción de ERO no fue estimulada al adicionar NADPH y al comparar la producción de ERO por espermatozoides obtenidos del epidídimo de murciélagos capturados en las diferentes fechas, se observa una clara tendencia a aumentar esta producción a mediados de septiembre, alcanzando sus valores más altos a mediados de octubre y manteniéndose altos hasta finales del mismo mes. La lipoperoxidación encontrada en espermatozoides de murciélago, coincide con lo reportado

para la misma especie, aunque, el fluido epididimario de murciélago no tuvo un efecto inhibitor de la lipoperoxidación en los espermatozoides de cerdo. La actividad enzimática determinada en testículo durante el ciclo anual, muestra un incremento en la actividad de SOD en la fase pre testicular, manteniendo su actividad de marzo a julio, disminuyendo drásticamente y casi completamente en agosto, manteniendo sus valores bajos hasta febrero. La actividad de CAT es particularmente importante durante el periodo de la regresión testicular y la actividad de la GPX es baja desde marzo hasta julio, meses de recrudescencia testicular, mientras que su actividad se incrementa en agosto y alcanza valores más altos en noviembre, cuando ocurre la regresión testicular. Por otro lado, la actividad de las enzimas antioxidantes en espermatozoides y fluido epididimario, resultaron similares a lo reportado para las regiones del epidídimo correspondiente de la misma especie, ya que en etapa post testicular se encontró una ausencia en la actividad de SOD en espermatozoides, y valores muy bajos en fluido epididimario, aunque se observó un pico en septiembre, presentando una pronunciada disminución a mediados de octubre, aumentando nuevamente a finales del mismo mes, comportamiento encontrado también en CAT y GPX. En espermatozoides de la región cefálica, la actividad de CAT alcanza sus valores más altos a principios de septiembre y la más baja a finales del mismo mes, fecha en que la actividad de CAT en espermatozoides de la región caudal alcanza sus valores más altos. De los resultados de actividad de GPX en espermatozoides de cabeza y cola del epidídimo, se obtiene un patrón similar en ambas regiones, pues los valores más altos encontrados se observan a mediados de septiembre, disminuyendo significativamente a finales de éste mes, y permaneciendo bajos hasta la última fecha de captura. En el fluido epididimario, la actividad de CAT presenta un patrón similar en la región cefálica, que lo encontrado para SOD y GPX en ambas regiones, observando valores elevados en

septiembre, y permaneciendo baja hasta finales de octubre. El patrón de actividad de CAT en la región caudal, se presenta muy baja a mediados de septiembre, y aumenta gradualmente hasta llegar a sus valores más altos a finales de octubre. El equilibrio redox asociado con los micro ambientes testiculares y epididimarios mediante los cuales los espermatozoides se trasladan, deben ser específica y diferencialmente controlados para asegurar su adecuada función. Nuestros datos demuestran que existe la necesidad de éste sistema de regulación, entre la producción de ERO y la actividad de las enzimas antioxidantes en testículo y epidídimo del murciélago *C. mexicanus* durante su ciclo reproductivo.

ABSTRACT

In this up-to-date study we determined: 1st the generation of ROS in sperms and fluid epididymaries of *Corynorhinus mexicanus* bat in the period of maturation and sperm storage, 2nd the lipid peroxidation levels, such as the participation of epididymal fluid of this bat as inhibitor of lipid peroxidation, using washed sperms of bat epididymis and washed ejaculated sperm of pig (as control) and 3rd determination of the antioxidants enzymes activities SOD, CAT and GPX in testicles, differentials in fluid and the sperms isolated from cephalic and caudal regions of the epididymides, with the objective of studying the relation which exists between the activity of these antioxidant enzymes, the levels of lipid peroxidation and the generation of ROS in this study model. The pattern observed in the bat shows only one reproductive annual cycle with temporal asynchrony between the primary reproductive functions and the secondary. The first registry of sperm cells from the epididymis we observe at the end of August and this continues until the end of October (last registered date). In the production of ROS we observed the following tendency: pig>head>tail, the production of ROS did not increase with the addition of NADPH, and comparing the production of ROS from the sperms obtained from the bat epididymis captured at different dates we observed a clear tendency to increase this production about the middle of September reaching its highest level around the middle of October and remaining high until the end of that same month. The lipid peroxidation found in bat sperm, coincides with that reported in the same species, and the epididymal fluid of the bat did not have an inhibitor effect in the lipid peroxidation of the pig sperm. The enzymatic activity determined in the testicle during the annual cycle shows an increase in the SOD activity in the pre testicular phase, maintaining this activity through

March to July. It diminishes drastically, almost completely in August, and keeps its low levels until February. The CAT activity is particularly important during the regression testicular phase and the GPX activity is low from March until July, months of the testicular recrudescence, whilst its activity increases in August and reaches its highest levels in November when the testicular regression occurs. On the other hand, the activity of the sperm cells antioxidant enzymes and epididymal fluid resulted similar to that reported by the organs of the same species. In this post testicular phase we found an absence in the sperm cells SOD activity, and very low levels of epididymal fluid, even though we observed a high point in September. This showed a pronounced drop around the middle of October, rising again at the end of that same month; this behavior was found also in CAT and GPX. In sperm cells from the cephalic region, the CAT activity reached its highest levels at the beginning of September and the lowest at the end of the same month, date in which the CAT activity in sperm from the caudal region reaches its highest level. From the results of the GPX in sperm activity from cephalic and caudal region of the epididymis, we obtained a similar pattern in both regions, because the highest levels were found around the middle of September and these diminished significantly at the end of this same month, remaining low until the last date of capture. In the epididymary fluid the CAT activity shows a similar pattern in the cephalic region to that found for SOD and GPX in both regions. We observed high levels in September, and they remained low until the end of October. The activity pattern of CAT in the caudal region is very low around the middle of September and this gradually increases reaching its highest level at the end of October.

The redox balance associated with the microenvironment testicular and epididymaries, through which the sperms pass, must be specific and differentially controlled to assure its adequate function. Our data shows that a good system exists of regulation between the

production of ROS and the antioxidant enzymes activity in testicle and epididymis in the bat *C. mexicanus* during its reproductive cycle. This good functioning depends on this regulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Actividad específica
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATC	Ácido tricloroacético
CAT	Enzima catalasa
CE	Conducto epididimario
COX	Citocromo C
DCF	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DUOX	Dual oxidasa
EDTA	Ácido etilendiamin-tetra-acético
ERO	Especies reactivas derivadas de oxígeno
FSH	Hormona folículo estimulante
FSII	Fotosistema II
G6P	Glucosa 6 fosfato
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPX	Enzima glutatión peroxidasa
GPX-c	Forma intracelular de GPX
GPX-p	Forma extracelular de GPX
GPX-PH	Forma específica de la GPX para lipoperóxidos
GR	Glutatión reductasa
GSH	Glutatión
GSSG	Glutatión oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HOCl	Ácido hipocloroso
hν	Energía de radiación
IFN	Interferón
IL-1	Interleucina-1
I.N.T.	cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio
LH	Hormona luteinizante
L-OO*	Radicales peróxido
MDA	Malondialdehido

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NOS	Oxido nítrico sintetasa
O₂	Oxígeno molecular
O₃	Ozono
O⁻	Radical anión superóxido
OH[·]	Radical hidroxilo
ONOOH	Ácido peroxinitroso
OSM	Medio estimulante del oviducto
PBS	Solución buffer fosfato
PHGPX	Enzima fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa
PLOOH	Fosfolipoperóxido
REDOX	Sistema de óxido reducción
ROO[·]	Radical peroxilo
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Enzima superóxido dismutasa
XOD	Xantina oxidasa

ÍNDICE

	PÁGINAS
1. Introducción	18
1.1. Especies Reactivas derivadas de Oxígeno (ERO) y sus implicaciones en la integridad espermática.	19
1.1.1. ERO y radicales libres	19
1.1.2. Producción de ERO por espermatozoides	24
1.1.3. Daño causado por ERO a espermatozoides	27
1.2. Enzimas anti- ERO como reguladores en algunos procesos reproductivos	30
1.2.1. Espermatogénesis	31
1.2.2. Maduración espermática	34
1.3. El murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i> y el almacenamiento prolongado de espermatozoides.	40
2. Justificación	42
3. Objetivos	43
4. Material y métodos	44
4.1. Material biológico	44
4.1.1. Captura y selección de los murciélagos	44
4.2. Trabajo de laboratorio	45
4.2.1. Manejo de organismos y obtención de órganos	45
4.2.2. Preparación de tejidos y células	46
4.2.2.1. Testículos	46

4.2.2.2. Epidídimos	47
4.2.2.3. Espermatozoides	48
4.2.3. Determinación de ERO	49
4.2.4. Determinación de lipoperoxidación	50
4.2.5. Determinación de la actividad enzimática	51
4.2.5.1. Superóxido dismutasa	52
4.2.5.2. Catalasa	52
4.2.5.3. Glutación peroxidasa	53
4.3. Análisis de resultados	54
5. Resultados y Discusión	55
5.1. Características somáticas de los murciélagos capturados.	55
5.2. Ciclo reproductivo	55
5.3. Registro de presencia y concentración de espermatozoides epididimarios	59
5.4. Determinación de ERO	62
5.5. Determinación de lipoperoxidación	71
5.6. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes	76
5.6.1. Testículo	76
5.6.2. Espermatozoides y fluido epididimarios	81
6. Conclusión	92
7. Apéndice I. Reactivos	94
8. Apéndice II. Soluciones	97
9. Apéndice III. Difusión de resultados	102
11. Bibliografía	113

1. INTRODUCCIÓN

Mucho se ha reportado sobre los efectos adversos que provocan las *especies reactivas derivadas de oxígeno* (ERO) a los espermatozoides, donde en la mayoría de los casos se ha observado que estos daños promueven la pérdida de su capacidad fertilizante. Sin embargo, también contamos con una basta cantidad de trabajos que demuestra la participación de las ERO en los mecanismos de señalización celular, de tal manera que, el balance entre los efectos positivos o negativos de las ERO en los espermatozoides, se encuentra sesgado hacia la participación de las enzimas antioxidantes: *superóxido dismutasa* (SOD), *catalasa* (CAT) y *glutación peroxidasa* (GPX); como pieza fundamental del mecanismo modulador de las ERO en los diferentes ambientes espermáticos, desde que los espermatozoides son formados en el testículo, hasta, que se lleva a cabo la fertilización en oviducto.

Por tal motivo, fue de nuestro interés el estudio de la participación de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX como reguladores de las ERO en los procesos de espermatogénesis, maduración y almacenamiento espermático en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, especie que presenta una particular asincronía entre las funciones reproductivas primarias y las secundarias, pudiendo prolongarse el almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo, hasta cuatro meses en ésta especie, donde al parecer, termina el proceso de maduración, algo inusual en la mayoría de los mamíferos.

1.1. ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DE OXÍGENO (ERO) Y SUS IMPLICACIONES EN LA INTEGRIDAD ESPERMÁTICA

Mientras progresa la división y diferenciación espermática, se llevan a cabo cambios dinámicos en el metabolismo y consumo de energía que genera una gran cantidad de productos entre los que se encuentran las ERO, mismas que se producen inevitablemente durante los procesos fisiológicos que involucren el consumo de oxígeno.

Cuando la generación de ERO excede los sistemas de defensa, se ha correlacionado con algunos problemas en la funcionalidad espermática (Fujii y col., 2003). Sin embargo producidos en cantidades adecuadas, se han vinculado con aspectos de la señalización inter e intra celular (Ford, 2004). De éste modo el que suceda uno u otro, dependerá del balance entre oxidantes y antioxidantes.

Las ERO incluyen formas reducidas de oxígeno, así como los productos de reacción del oxígeno con otras moléculas. Algunos, pero no todos los productos de estas reacciones son *radicales libres*.

1.1.1. ERO Y RADICALES LIBRES

Todos los átomos y moléculas están constituidos de partículas más pequeñas conocidas como *partículas subatómicas*; por un lado, *los protones y neutrones*, y por otro, *los electrones* que giran en torno al núcleo a través de “orbitales”. La mecánica cuántica llega a corregir el concepto de orbital mencionando que no tiene sentido hablar de órbita del electrón, y lo sustituye por el de *distribución de probabilidades*. Dicho de otro modo, un electrón se puede encontrar con cierta probabilidad en cualquier punto alrededor del

núcleo; las zonas del espacio donde la probabilidad de encontrarlo es mayor, corresponden a lo que en los modelos precedentes constituía la órbita. La distribución de probabilidades puede representarse matemáticamente mediante funciones de onda (resolviendo la ecuación de Schrödinger) que son los que reciben el nombre de orbitales, y que pueden ser descritos gráficamente (figura 1), fuera de cuyo contorno la probabilidad de encontrar un electrón es mínima.

Hay orbitales de forma esférica (tipo s), como en el caso del único electrón del átomo de hidrógeno, el más sencillo; orbitales de forma toroidal o de ocho (tipo p), que, a diferencia de los orbitales s , son múltiples y orientables en el espacio según los tres ejes cartesianos, y orbitales aún más complejos (tipo d ; figura 1).

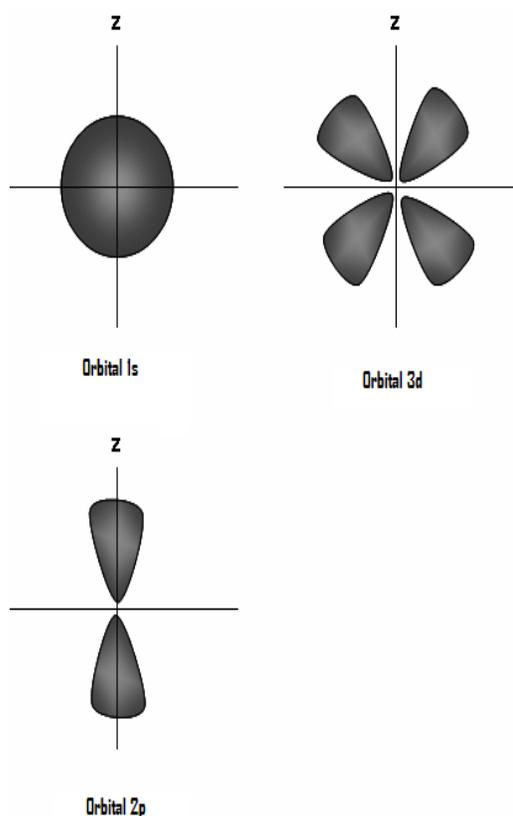


Figura 1 Los orbitales atómicos resultan de descripciones matemáticas de la probabilidad de encontrar en un lugar determinado a un electrón de un átomo o molécula. Los orbitales expuestos muestran la distribución espacial de electrones s , p y d .

Algo que se debe tomar en cuenta, es que, nunca puede haber más de dos electrones en un mismo orbital, así, la distribución global de electrones de un átomo o molécula es *la suma de muchos orbitales semejantes*. Cuando un orbital se encuentra lleno, los electrones que forman el par deben tener giros (*spin*) opuestos para anular recíprocamente su campo magnético, pero esto no siempre sucede, cuando en un orbital hay un sólo electrón se dice que no está apareado, así, cuando un átomo o molécula tiene uno o más electrones desapareados recibe el nombre de *radical libre* (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Los radicales libres suelen ser muy inestables, pues estos átomos o moléculas que poseen electrones desapareados buscarán con avidez completar el par electrónico que anule su campo magnético, favoreciendo así la colisión entre las moléculas y su aproximación con ellas. Es la razón de que las reacciones en las que intervienen suelen ser muy rápidas, tanto, que el tiempo de vida en algunos casos es del orden de nanosegundos (Cuadro 1; Halliwell y Gutteridge, 1999).

pues se produce fundamentalmente por la reducción divalente del O_2 y dará origen a otro radical libre por captación de un electrón y un protón, otra de las principales ERO, el llamado ion hidroxilo (OH^\cdot ; figura 2).

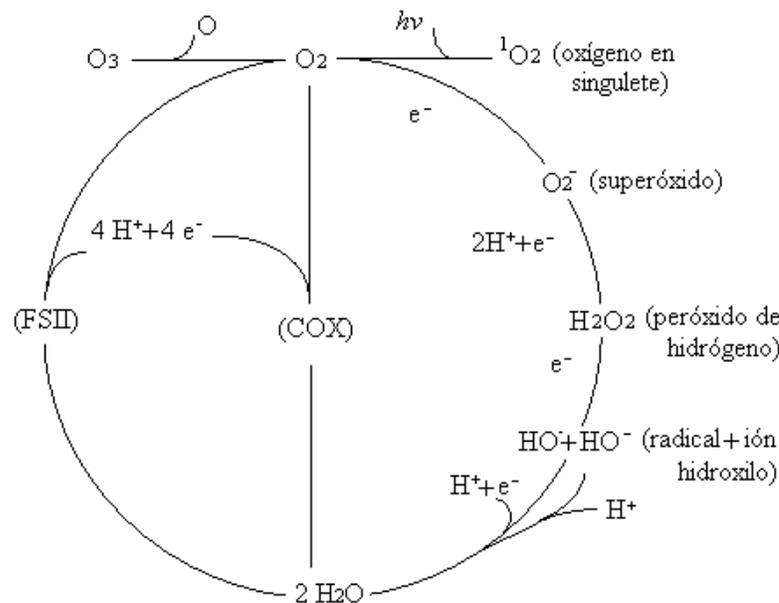


Figura 2. Formación de las principales ERO a partir del oxígeno molecular. Tomada de Domínguez, 2007; (Donde FSII es el fotosistema II; COX es el citocromo c; NOS es el óxido nítrico sintasa; O_3 es el Ozono y $h\nu$ es la energía de radiación).

El anión superóxido es producido *in vivo* constantemente en pequeñas cantidades, por acción de algunas enzimas entre las que se encuentran: citocromo P_{450} dependiente de oxigenasas (Coon y col., 1992), y por la conversión proteolítica de xantina deshidrogenasa xantina oxidasa, que provee otra fuente enzimática de O_2^- , H_2O_2 , y por lo tanto OH^\cdot (Yokoyama y col., 1990).

La fuente no enzimática de O_2^- ocurre, cuando un electrón es transferido al oxígeno por reducción de coenzimas o grupos prostéticos, o por xenobióticos previamente reducidos por ciertas enzimas. La cadena respiratoria mitocondrial contiene varios centros

redox que tomarán electrones del oxígeno, constituyendo así la fuente principal de O_2^- en la mayoría de los tejidos (Turrens, 2003).

Las ERO producidas de esta manera son usualmente relacionadas con productos tóxicos e implicadas en la causa de enfermedades y envejecimiento (Raha y Robinson, 2000). Algunas células tienen otros mecanismos para producir ERO con propósitos fisiológicos, como los leucocitos fagocíticos que contienen un tipo de enzima membranal llamada: NADPH oxidasa, misma que produce O_2^- en vesículas fagocíticas durante “la reacción de muerte” (Segal y Abo, 1993; Babior y col., 1997; Babior, 1999). Sin embargo, entre las células que producen ERO con fines fisiológicos encontramos a los espermatozoides.

1.1.2. PRODUCCIÓN DE ERO POR ESPERMATOZOIDEOS

En el trabajo de Tosic y Walton (1950) se demostró que los espermatozoides de toro, verraco y carnero pueden producir H_2O_2 por acción de una oxidasa que actúa en aminoácidos L-aromáticos. Posteriormente Holland y colaboradores (1981) probaron que los espermatozoides de conejo son capaces de producir H_2O_2 por dismutación de O_2^- resultado de la actividad de la enzima SOD (Holland y col., 1982; Álvarez y Storey, 1984). Estos estudios usaron citocromo C (COX) acetilado para detectar O_2^- así como, la oxidación de COX acetilado por acción de la enzima COX peroxidasa para detectar H_2O_2 , técnicas que resultan confiables; a diferencia de algunas que solo reflejan la contaminación por leucocitos (células que resultan prolíficas fuentes de ERO; Álvarez y col., 1987); como los trabajos que asocian la producción de ERO con espermatozoides defectuosos (Aitken y Clarkson, 1987; Aitken y col., 1989; Iwasaki y Gagnon, 1992).

Aun, cuando es claro que muchos de las ERO detectadas experimentalmente fueron producto de leucocitos (Babior y col., 1997), un buen número de trabajos donde también determinan la producción de ERO, remediaron éste problema removiendo los leucocitos y confirmando su ausencia (Krausz y col., 1992, 1994), entre los que se encuentran ensayos hechos con luminol donde detectan H_2O_2 , mismos que proponen que el exceso de glucosa-6-fosfato(G6P) deshidrogenasa, una enzima crucial en la vía de las pentosas fosfato (Gómez y col., 1996), permite la producción de grandes cantidades de NADPH, y que éstas, por acción de una NADPH oxidasa, presente en la membrana de los espermatozoides, promoverá la formación de O_2^- , y que por dismutación de éste, al H_2O_2 (Aitken y col., 1992; Aitken y col., 1994; Gómez y col., 1996).

Se ha observado que el citoplasma asociado con espermatozoides, garantizará la producción de ERO por la vía de las pentosas, así, entre mayor sea la concentración de espermatozoides con citoplasma residual (inmaduros), se producirá un exceso de NADPH que a su vez promoverá que se incremente la producción de ERO. Correlaciones se han observado entre la concentración de citoplasmas residuales, contenido de G6P deshidrogenasa y la actividad redox en espermatozoides humanos (Aitken y col., 2004; Gomez y col., 1996).

Además se observó que la adición extracelular de NADPH puede promover la capacitación espermática debido a la formación de H_2O_2 , mismo que participa en la fosforilación de tirosina, y que la producción de O_2^- puede ser mantenida con la adición de NADPH o NADH, e interrumpida con inhibidores de flavoproteínas, de manera similar a lo que ocurre con la NADPH oxidasa en leucocitos, y se percibió que ésta producción no fue afectada por inhibidores mitocondriales o de diaforasas (enzimas que se localizan principalmente en: citosól y membrana en espermatozoides, transfiriendo electrones desde el

NADH o NADPH a un aceptor electrónico semejante al 2,6-diclorofenol indofenol, mismas que juega un papel importante en la formación de ERO), y el efecto de la NADPH fue localizado en la fracción membranal (Aitken y col., 1997; Griveau y LeLannou, 1997; Aitken y col., 2003). Se vio también, que al agregar NADPH a concentraciones elevadas (5-10 nmol/l) ocasionó lipoperoxidación y oxidación al ADN (Aitken y col., 1998a; Twigg y col., 1998a, b).

Estas observaciones fueron corroboradas además con la actividad de NADPH oxidasa membranal, que posteriormente se revalidó con el trabajo de Banfi y colaboradores (2004), que dan a conocer que el gen de la NADPH oxidasa, miembro de la familia NOX5, es expresado en espermatoцитos primarios de humanos. Sin embargo, la presencia de esta enzima no ha sido confirmada en espermatozoides maduros.

No obstante, un trabajo donde usan Western blot para determinar la presencia de proteínas que se unen a anticuerpos anti componentes del complejo NADPH oxidasa de leucocitos (NOX2) incluyendo gp91phox, p67(phox), p47 phox y p40 (phox); propone, que esta inusual oxidasa es regulada por la disponibilidad de p40 (phox) y es independiente de p22 (phox); además sostiene que esta oxidasa alcanza su actividad máxima en espermatozoides testiculares, pero disminuye gradualmente conforme avanza la maduración espermática, pues al parecer uno de los componentes indispensables para la actividad de la NADPH oxidasa, aparentemente, se encuentra ausente en espermatozoides epididimarios (Shukla y col., 2005). La confirmación del patrón de actividad de la NADPH oxidasa en las diferentes fases de maduración espermática, resulta de gran importancia, ya que de acuerdo con éste trabajo, la participación de las ERO en espermatozoides, producto de la actividad de ésta oxidasa, es inversamente proporcional a su estado de maduración.

Así, la producción de H_2O_2 por espermatozoides, no solo es resultado de la actividad de la NADPH oxidasa, pues se ha confirmado que depende también en gran medida de la actividad mitocondrial (Ford, 2004), e incluso, se ha demostrado que lo reportado para espermatozoides epididimarios de rata, donde sugieren la actividad de la NADPH oxidasa como fuente primordial de ERO, es en realidad, producto de la actividad de la citocromo-B5 reductasa localizada en células epiteliales, que pudieran haber contaminado la suspensión espermática (Baker y col., 2004; Baker y col., 2005). Esto acaba con la mayoría de las evidencias sobre la producción de las ERO dada por la actividad de la NADPH oxidasa en espermatozoides epididimarios de roedores, y centraría la atención en la mitocondria como fuente principal de ERO en éstas especies.

1.1.3. DAÑO CAUSADO POR ERO A ESPERMATOZOIDEOS

Cuando la interacción de las ERO con moléculas susceptibles a oxidación excede a los sistemas de defensa, provoca un estado que se denomina *estrés oxidativo*. El estrés oxidativo se produce al generarse una cascada de eventos intracelulares que puede resultar o en la *adaptación* o en el *daño celular*. En el primero de los casos, se consigue la regulación positiva de los elementos que forman parte del sistema de defensa antioxidante, esto, en un intento por restaurar el balance oxidante/antioxidante de la célula. Sin embargo en el segundo de los casos, el estrés oxidativo puede provocar daños o incluso la muerte celular.

Las ERO pueden reaccionar con un amplio rango de moléculas biológicas entre las que se encuentran: los ácidos grasos insaturados de las membranas, los sulfhidrilos de las proteínas y los ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Por tal motivo, las ERO

están involucradas en una gran cantidad de enfermedades involucradas con la infertilidad masculina (Foresta y col., 2002).

Desde el primero de los reportes sobre los efectos adversos de las ERO a los espermatozoides (Macleod, 1943), hasta la fecha, se publicaron una gran cantidad de trabajos a éste respecto, siendo ahora totalmente aceptado que la sobreproducción de ERO en una suspensión de espermatozoides, estará asociada con problemas en la función espermática y la subfertilidad, debido sobretodo a daño en membranas (lipoperoxidación) y oxidación al ADN (Aitken y col., 1991; Sukcharoen y col., 1995; Storey, 1997; Lopes y col., 1998; Whittington y col., 1999; Shen y Ong, 2000; Agarwal y col., 2003).

La exposición de espermatozoides humanos a ERO induce la pérdida de su movilidad, evento que se correlaciona directamente con la lipoperoxidación (Gómez y col., 1998), debido probablemente a los cambios en la fluidez e integridad de membrana y sucesivamente a los problemas para mantener el movimiento flagelar, sumado a esto, la lipoperoxidación desestabiliza otras funciones espermáticas dependientes de la integridad membranal, entre las que se encuentran: la capacitación, la reacción acrosomal y la fusión del espermatozoide con el ovocito (Aitken y col., 1993a, b).

Se ha observado en espermatozoides de humano y hámster, que el efecto provocado por las ERO al ADN incluye: daño oxidativo en sus bases nitrogenadas (modificación y/o supresión), ruptura de la cadena de ADN y re-arreglo cromosómico. Estos daños se han observado, en ambos tipos de ADN: nuclear y mitocondrial (Halliwell y Aruoma 1991).

Usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para calcular la suma de daño al ADN, se ha observado que el genoma mitocondrial ha resultado ser mucho más susceptible al daño causado por las ERO, que el genoma nuclear (Sawyer y col., 2003), ya

que en éste estudio, el genoma nuclear resultó ser particularmente resistente al daño oxidativo.

Esta resistencia radica en la hiper compactación del ADN de los espermatozoides obtenida durante la diferenciación, donde las histonas nucleares son progresivamente reemplazadas por otras proteínas conocidas como protaminas (Fuentes-Mascorro y col., 2000). Las protaminas poseen una gran cantidad de residuos de cisteína que llegan a ser oxidados durante el tránsito por el epidídimo, formándose una serie de puentes disulfuro inter e intra moleculares, que sirven para estabilizar el ADN nuclear, haciéndolo así, más resistente al daño oxidativo (Bennettes y Aitken, 2005).

Motivo por el cual, el ADN de los espermatozoides obtenidos de la región cefálica del epidídimo resultan más susceptibles al daño oxidativo, que aquellos obtenidos de la región caudal (Kodama y col., 1997; Chen y col., 2002). Por tal motivo, el daño al ADN en espermatozoides eyaculados podrían provenir de tres fuentes principales: una mala compactación y una apoptosis inconclusa durante la espermatogénesis, así como, un desequilibrio entre el sistema de protección y las ERO (Sakkas y col., 1999).

1.2. ENZIMAS ANTI-ERO COMO REGULADORES EN PROCESOS REPRODUCTIVOS

Cuando las células espermáticas son liberadas del testículo, su genoma está lo suficientemente empaquetado para ocasionar una poca accesibilidad bioquímica, es decir, resultando inerte para la transcripción (Sotolongo y Ward, 2000), sin embargo, éstas células sufren profundos cambios durante su paso por el epidídimo (maduración; Aitken, 2000), durante el paso por el tracto reproductor femenino (capacitación; Smith, 1998) y en el momento previo a la fertilización (reacción acrosomal; Blackmore, 1993).

Estos cambios podrían conseguirse por modificaciones en las proteínas existentes, que a su vez, podrían ser moduladas por señales venidas desde los diferentes ambientes espermáticos, aunque también pueden ocurrir espontáneamente. Así, la fisiología de los espermatozoides dependerá de una compleja red de señales intra y extracelulares, favoreciendo así, la preservación de la homeostasis.

De entre las señales extracelulares que más se conocen, se encuentran la participación de citocinas, hormonas y neurotransmisores que se unen a receptores específicos de la superficie celular, mismas que al unirse con su receptor, pueden generar varios tipos de señales intracelulares como cambios en la concentración de iones, activación de proteínas G y activación de cinasas (Thannickal y Fanburg, 2000). Estos cambios a su vez provocarán la liberación de segundos mensajeros (AMPc, Ca^{2+} , y metabolitos de fosfolípidos) y la fosforilación de proteínas; procesos que resultan esenciales para las diversas funciones celulares (Thannickal y Fanburg, 2000).

Se ha reportado que las ERO se encuentran entre los mensajeros que intervienen en la función espermática durante su tránsito, desde el testículo hasta el ovocito, y que son producidos por los mismos espermatozoides (Ford, 2004).

1.2.1. ESPERMATOGÉNESIS

El propósito de la espermatogénesis, es generar células haploides que al encuentro con la célula haploide femenina homoespecífica, se de la combinación genética para la perpetuación de la especie. De éste modo, abastecer al macho de suficientes espermatozoides diferenciados para el momento en que se lleve a cabo la cópula, misma que dependerá en cada especie, de su periodicidad reproductiva.

La periodicidad reproductiva masculina se puede agrupar en dos amplias categorías: La primera de ellas, por especies que presentan más de un ciclo reproductivo al año, dándose la recrudescencia y la involución testicular, ya sea de forma bimodal (cuando las hembras presentan poliestría bimodal) o que tienen una capacidad reproductiva continua (cuando las hembras presentan más de dos ciclos estrales al año); La segunda, incluye especies cuya periodicidad en la actividad testicular se lleva a cabo una vez estacionalmente, de manera paralela con el ciclo monoéstrico de las hembras (León-Galván, 2008).

La mayoría de los murciélagos se reproduce estacionalmente, y en el caso particular de los vespertilionidos y rinolofidos que habitan en zonas templadas, la espermatogénesis involucra la recrudescencia seguida por una profunda involución de los túbulos seminíferos, y en algunas especies la migración de los testículos hacia el canal inguinal (León-Galván, 2005).

Se ha observado que la apoptosis juega un papel muy importante en la involución testicular que ocurre de manera natural en las especies que presentan una reproducción estacional (Furuta y col., 1994; Strbenc y col., 2003). En hámster y rata la regresión testicular inducida por la exposición crónica a dietilbestrol fue asociado con un aumento significativo en la apoptosis (10-50 veces más que en el testículo control; Nonclercq y col., 1996; Nair y Shaha, 2003). Proceso que involucra: espermátides, espermatocitos y en menor medida espermatogonias. Ya entonces, el epitelio seminífero fue progresivamente limitado a las células de Sertoli y espermatogonias (Nair y Shaha, 2003; Nonclercq y col. 1996).

En la espermatogénesis llevada a cabo en mamíferos, la proliferación y diferenciación requiere cierto grado de control de calidad que es asegurado también por apoptosis (Sinha-Hikim y Swerdloff, 1999), pues de los espermatozoides que se esperaban, del 25% al 75% son perdidos por éste proceso (Johnson y col., 1983).

La espermatogénesis es controlada inicialmente por la liberación hipotalámica de GnRH, que estimula la secreción de FSH y LH de la hipófisis (McLachlan, 2000). Siendo la LH primeramente, la responsable de estimular la secreción de testosterona por las células de Leydig localizadas en el estroma testicular. A partir de esto, muchos factores internos son producidos en el epitelio seminífero, y entre aquellos involucrados en el control de calidad se encuentran los reguladores de apoptosis como son: Bax, Bcl-2, Fas/FasL y varias caspasas (Sinha-Hikim y col., 2003), mismos que se piensa, están involucrados en la eliminación de las células espermatogénicas por apoptosis. En particular el gen bcl-w que parece, tiene un papel en la subsistencia testicular, pero no en otros tejidos (Print y col., 1998).

La apoptosis de las células testiculares también puede ser estimulada por varias condiciones de estrés, incluyendo la exposición del testículo a compuestos tóxicos (Cai y col., 1997; Krishnamoorthy y col., 2005), exposición al calor (Ikeda y col. 1999; Miura y col. 2002) y particularmente por estrés oxidativo (Buttke y Sandstrom 1994; Tilly y Tilly 1995; Kumagai y col. 2002).

Sin embargo, aun cuando es bien conocida la susceptibilidad de las células somáticas y germinales del testículo al estrés oxidativo, la presencia y distribución celular del sistema de protección, particularmente de las enzimas antioxidantes, ha sido claramente demostrado; pues se ha reportado en el humano, que las células germinales expresan una actividad importante de Cu/Zn SOD citosólica y Mn SOD (Bauché y col. 1994; Fujii y col. 2003); también se han reportado altos niveles de fosfolípido hidroperóxido GPX (PHGPX) en testículo (Roveri y col. 1992, Fujii y col. 2003), principalmente en la capa de espermátides (Maiorino y col. 1998).

Por otro lado, se ha mostrado que las células de Leydig, células mioideas peritubulares y células de Sertoli tienen altos niveles de SOD (Bauché y col. 1994; Luo y col. 2006), CAT (Kukucka y Misra 1993) y GPX (Bauché y col. 1994; Luo y col. 2006).

Se ha visto que los niveles de actividad de SOD en testículo de rata, es similar a los niveles en hígado, pero no así, la actividad de GPX y CAT, que solo representan el 5% y 2% respectivamente, de la actividad del hígado (Ikeda y col. 1999). Por otro lado, Roveri y colaboradores (1992) encontraron en rata, que la mayoría de la actividad peroxidasa en el testículo está dada por PHGPX, siendo hasta veinte veces más alta en homogeneizado de testículo, con respecto a lo encontrado en hígado. Posteriormente fue confirmado que el testículo de mamíferos posee la actividad de PHGPX más alta, entre todos los tejidos

usados en ese estudio (Roveri y col. 2002), localizada principalmente en espermátides, y en tres formas derivadas de un solo gen: citosólica, mitocondrial y nuclear.

El comportamiento característico de las enzimas antioxidantes durante el ciclo reproductivo estacional, pudiera no solo estar relacionado con su protección antioxidante (Nomura y col. 1999; Brielmeier y col. 2001), sino también se propone el papel de estas enzimas como importante regulador del contenido de ERO y a través de este mecanismo como regulador general del metabolismo celular (Irani y col. 1997; Finkel 1998). De hecho, las ERO considerando el equilibrio generación ERO/limpieza de ERO, ha sido implicado en el desarrollo celular (Wang y col. 2003) y diferenciación (Yang y col. 2002). De manera similar el PLOOH de la membrana celular, regulado por la actividad de las enzimas antioxidantes, principalmente por la GPX (Li y col. 2000; Wang y col. 2003), como moduladoras de importantes procesos fisiológicos (Thannickal y Fanburg 2000).

1.2.2. MADURACIÓN ESPERMÁTICA

Los espermatozoides liberados del testículo no son capaces de exhibir movilidad progresiva ni de capacitarse, ya que adquieren ésta habilidad durante su paso por el epidídimo, este proceso es conocido como *maduración espermática*. Otros cambios relativos a la maduración, incluyen la terminación de la condensación nuclear y cambios en la expresión y distribución de las moléculas de la superficie espermática (Cooper, 1995; Moore, 1996).

El tiempo que tardan los espermatozoides en atravesar el epidídimo, ha sido estudiado en humano, marcando éstas células con timidina, donde el tiempo fue estimado entre 1 y 21 días (11 días en promedio; Rowley y col., 1970), encontrando que el tránsito

rápido (hasta 2 días) se presentó en individuos que exhiben una elevada producción diaria de espermatozoides (Johnson y Varner, 1988), debido probablemente a una escasez de los mismos (Turner y Reich, 1985).

De manera interesante, éste tránsito rápido es normal en chimpancés (Smithwick y col., 1996), aunque en una situación diferente, pues el tamaño testicular es grande, y grande también la producción espermática.

Los murciélagos pertenecientes a las familias vespertilionidos y rinolofidos muestran una asincronía temporal en el desarrollo y la función de los órganos reproductores de los machos (Kruttsch 2000; León-Galván, 2005). Particularmente, el desarrollo de los testículos y la espermatogénesis se lleva a cabo principalmente en el verano, mientras que el desarrollo de las glándulas accesorias, la libido y el apareamiento en otoño. Esta asincronía resulta en un inusual largo periodo de almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo, el cual puede extenderse por varios meses después de que los testículos han involucionado totalmente (Racey y Entwistle 2000). Intentos iniciales para explicar ésta importante estrategia reproductiva, sostiene la idea de que el almacenamiento prolongado de espermatozoides podría ser una consecuencia natural del descenso de la temperatura corporal en los hibernantes. Sin embargo, es bien conocido que existen muchas especies tropicales de zonas altas que no son hibernantes, y que también presentan almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo (Gopalakrishna y Bhatia 1980; Karim y Banerjee 1985; Singh y Krishna 1995). Aunado a esto, algunas especies de murciélagos hibernantes que almacenan espermatozoides, despiertan regularmente durante el periodo de hibernación (Avery 1985).

El almacenamiento prolongado de espermatozoides resulta más interesante si tomamos en cuenta, que la maduración se desarrolla gradualmente de manera específica,

cuando los espermatozoides avanzan desde la región cefálica hasta la región caudal del epidídimo; completando su maduración regularmente, antes de alcanzar la región caudal, posteriormente son almacenados hasta la eyaculación.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, los espermatozoides se encuentran en serio riesgo durante su tránsito por el epidídimo, debido al continuo efecto de las ERO (estrés oxidativo), deteriorando críticamente la capacidad fertilizante y su integridad genética (Aitken 1999). Sin embargo, como también se comentó, las ERO pueden ser producidas por los mismos espermatozoides y por algunas células no fagocíticas que pueden estar presentes en el tejido epididimario (Matsubara y Ziff 1986; Plante y col.1994).

Se ha propuesto que las ERO también juegan un papel importante en la regulación de la maduración, ya que las ERO están involucradas en la iniciación de la movilidad por incrementar la síntesis de AMPc y la fosforilación de proteínas (Aitken, 2000).

Durante la maduración en el epidídimo, los espermatozoides adquieren la capacidad para moverse, y por encima de la capacitación, estos sufren una cantidad de cambios en su movilidad, ganando su capacidad fertilizante (Yanagimachi y col., 1994). Esto es, debido a los eventos de fosforilación/defosforilación, que se llevan a cabo principalmente en las proteínas del flagelo (Tash, 1989; Tash y Bracho, 1994).

La fosforilación de tirosina en las células, es promovida por la unión de ligandos con su receptor. Sin embargo, las ERO también pueden promover la fosforilación de tirosina en la proteínas (Aitken y col., 1995; Caselli y col., 1998). Muchos estudios han sugerido que la estabilización de la estructura espermática durante la maduración epididimaria, es completada principalmente por la oxidación de los grupos tioles durante su tránsito a lo largo del epidídimo (Shalgi y col., 1989; Seligman y Shalgi, 1991). De la

misma manera, la capacidad de los espermatozoides para sufrir fosforilación de tirosina, también es incrementada durante el tránsito de los espermatozoides, desde la región cefálica hasta la región caudal del epidídimo (Visconti y col., 1995; Lewis y Aitken, 2001).

En algunos tipos celulares el aumento en la fosforilación de tirosina fue sugerido como resultado de la oxidación y directa activación de la cinasa de proteínas (Gamou y Shimizu, 1995; Guyton y col., 1996). Sin embargo, se ha observado que el centro activo de las fosfatasas de proteínas contienen una gran cantidad de residuos de cisteína esencial para la actividad fosfatasa (Tonks, 2003; Van Montfort y col., 2003), de éste modo, los efectos inhibitorios de los oxidantes en la actividad de las fosfatasas, se ha considerado el mecanismo más probable, e indirectamente responsable de la fosforilación de tirosina (Haffetz y col., 1990; Zipser y col., 1997; Van Montfort y col., 2003; Seligman y col., 2004)

De ahí la gran importancia de mantener un balance entre la producción celular de ERO y su destrucción.

De los componentes encargados de la regulación de las ERO, se encuentra entre los más importantes, las enzimas antioxidantes: SOD, CAT y GPX.

De la GPX se ha encontrado una gran número de isoformas, de éstas, aquellas que se relacionan con el epidídimo son: GPX1, 3, 4 y 5 (Vernet y col., 2004); donde GPX5 ha sido localizada en el epitelio del epidídimo y en espermatozoides (Ghyselinck y Dufaure, 1990), pudiendo ser secretada hacia el lumen epididimario, donde se encuentra en forma libre o asociada a espermatozoides, ésta última, aumentando conforme avanzan de la región cefálica a la región caudal del epidídimo, y permaneciendo hasta el tracto reproductor femenino (Jiménez y col., 1992; Vernet y col., 1997; Rejraji y col., 2002).

La actividad de GPX1 está relacionada principalmente con la regulación del H₂O₂ ó terbutil hidroperóxido en extractos totales de epidídimo, y la GPX3 también es expresada en epidídimo, aunque siendo en la región cefálica su expresión muy baja, no así en la región caudal (principal sitio de expresión en ratón), donde permanece en el citosol de las células epiteliales. Siendo la actividad de ésta enzima dependiente de andrógenos en la región del cuerpo y cola del epidídimo, e independiente en la región cefálica (Maser y col., 1994; Schwaab y col., 1995).

La GPX4 ó PHGPX está presente en espermatozoides epididimarios, principalmente en la cabeza y pieza media de los mismos, así como en el núcleo, donde exhibe una actividad de tiol oxidasa en protaminas, siendo mayor en aquellas provenientes de espermatozoides obtenidos de la región cefálica que los obtenidos de la región caudal, pudiendo así, contribuir a la condensación nuclear durante su tránsito por el epidídimo, ya que, la compactación de la cromatina constituye una de las vías principales en la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Rousseaux y Rousseaux-Prevost, 1995; Godeas y col., 1997). Estos resultados sugieren un papel primordial en la maduración espermática mediante el papel de la GPX en el metabolismo de hidroperóxidos y oxidación de tioles, en suma con su participación antioxidante.

Experimentos realizados en el epidídimo de rata muestran que la síntesis celular de la prostaglandina es parcialmente regulada por hidroperóxidos a niveles intracelulares, por tal motivo, PHGPX estaría participando en ésta regulación mediante la reducción de los mismos (Shitashige y col., 1998; Sakamoto y col., 2000). Actividad extremadamente importante en la regulación de la maduración.

La participación de la CAT en el epidídimo, es una de las más controversiales, pues aunque se ha demostrado su presencia a niveles muy bajos en espermatozoides de humano

y rata (Alvarez y col., 1987; Jeulin y col., 1989; Tramer y col., 1998), ésta, se encuentra ausente en espermatozoides de conejo (Holland y Storey, 1981), ratón (Alvarez y Storey, 1984) y toro (Bilodeau y col., 2000); pero presente en el ambiente espermático durante el tránsito por el epidídimo y en el eyaculado (Jeulin y col., 1989; Zini y col., 1993; Bilodeau y col., 2000), encontrando que los patrones de expresión de ésta enzima, involucra no solo el epitelio epididimario, sino también otros tejidos del tracto reproductor masculino a excepción de las vesículas seminales (Zini y Schlegel, 1997). Sin embargo, la expresión del RNAm de CAT es tan baja, que se menosprecia el papel de ésta enzima como antioxidante en estos tejidos.

La SOD es expresada a niveles altos en el epidídimo, y no varía significativamente en sus diferentes regiones (Jervis y Robaire, 2001). En la región caudal del epidídimo, puede relacionarse con la protección de los espermatozoides en contra del estrés oxidativo, y asociada con la membrana plasmática de los espermatozoides epididimarios, podrían promover la producción del H_2O_2 que estaría participando en la fosforilación de tirosina, evento asociado con la maduración (Lewis y Aitken, 2001), que como ya se mencionó anteriormente, en el caso particular de las especies que presentan almacenamiento prolongado de espermatozoides, como el murciélago *C. mexicanus*, resulta muy interesante.

1.3. EL MURCIÉLAGO *Corynorhinus mexicanus* Y EL ALMACENAMIENTO PROLONGADO DE ESPERMATOZOIDES

El murciélago *C. mexicanus* es una especie endémica de nuestro país que habita las zonas mas altas y húmedas de los principales sistemas montañosos de México, habitualmente localizada por arriba de los 2000 m.

Las hembras presentan una actividad reproductiva de tipo monoéstrica; mientras que los machos, revelan solo un ciclo reproductivo al año y una asincronía temporal entre sus funciones reproductivas primarias y las secundarias, como ya se había mencionado, pues, el máximo tamaño de los testículos se observa en el mes de agosto, mientras que el máximo desarrollo de los epidídimos y el grupo de glándulas sexuales accesorias, fue observado de 1 a 3 meses después, lo cual indica un almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo, de hasta cuatro meses (López, 1989; León-Galván y col., 1999; León-Galván y col., 2005).

Hay que resaltar que el fenómeno de almacenamiento prolongado de espermatozoides ya ha sido abordado por diversos investigadores desde el punto de vista histológico y bioquímico, encontrando que los espermatozoides en el epidídimo de algunas especies de murciélagos, son almacenados por varios meses, los cuales pueden presentar la reacción acrosomal retardada (Crichton y col., 1993; Cervantes y col., 2008), para lo cual existe una hipótesis que ayuda a comprender como es que los espermatozoides pueden mantenerse viables por tanto tiempo. Esta hipótesis se refiere al aumento de la osmolaridad en el lumen del túbulo en la cola del epidídimo, pudiendo prolongar la vida de los espermatozoides induciendo la deshidratación parcial (Crichton y col., 1994). Sin embargo, de los estudios realizados con el murciélago *C. mexicanus* se ha encontrado:

Por un lado, que las secreciones que produce el tracto genital femenino, mantiene a los espermatozoides viables y con capacidad fertilizante durante largo tiempo, efecto debido a la capacidad de dichas secreciones de inhibir la lipoperoxidación (León-Galván y col., 1999), y por otro lado, que la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX están presentes en la región cefálica y caudal del epidídimo, pudiendo ser, importantes en la modulación de las ERO en los procesos de maduración y almacenamiento de espermatozoides (Arenas-Ríos, y col., 2005), procesos inusualmente largos en esta especie (López, 1989; León-Galván y col., 1999; León-Galván y col., 2005).

En ese sentido se realizó un estudio que ayuda a comprender aun mejor las razones del almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago *C. mexicanus*, estudiando la presencia de gota citoplasmática, y la inducción de la capacitación y la reacción acrosomal en espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones epididimarias a través de su ciclo reproductivo anual, resultando por un lado, que el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo es rápido, y por otro, que se mantiene un alto porcentaje de espermatozoides con gota citoplásmica al llegar a la región caudal del epidídimo, además de un bajo índice de capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides obtenidos del cuerpo, que incrementa significativamente durante su estancia en la región caudal. Lo que indica que el proceso de maduración espermática en el murciélago *C. mexicanus*, a diferencia de lo reportado en otras especies de mamíferos, es completada en la región caudal del epidídimo (Cervantes y col., 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido al patrón reproductivo del murciélago *C. mexicanus*, que presenta una asincronía temporal entre las funciones reproductivas primarias y las secundarias; y un almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, ésta especie, nos ofrece la oportunidad de estudiar la participación del sistema enzimático de defensa conformado por CAT, SOD y GPX presentes en el testículo durante su ciclo anual; así como en el epidídimo; por un lado, como mecanismo de protección, y por otro, como modulador de la concentración de las ERO, en el testículo y en epidídimo, que pudieran participar en los diferentes procesos de maduración espermática.

Además se decidió utilizar espermatozoides de cerdo de la raza *Large white*, como control, los cuales son altamente susceptible a los efectos de las ERO por la lipoperoxidación, para ver si el fluido epididimario del murciélago *C. mexicanus* anula éste el efecto.

3. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la importancia de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en los procesos de diferenciación de las células germinales y maduración espermática, en el murciélago *C. mexicanus*.

PARTICULARES

- Registrar el peso de los testículos y epidídimos para contar con un parámetro que indique el ciclo de cambios en los principales órganos sexuales a lo largo del ciclo anual.
- A partir de la obtención de espermatozoides de las tres principales regiones del epidídimo, determinar la concentración y compararla entre las diferentes fechas del ciclo reproductivo.
- Determinar la generación de ERO, en espermatozoides y la concentración luminal de ERO en el epidídimo de *C. mexicanus* durante las diferentes etapas del ciclo reproductivo de este murciélago.
- Determinar los niveles de lipoperoxidación y la participación del fluido epididimario de este murciélago como inhibidor de lipoperoxidación, en espermatozoides lavados de epidídimo de murciélago y espermatozoides lavados de eyaculado de cerdo.
- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX; en testículo.

- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX; en fluido epididimario y espermatozoides (obtenidos del epidídimo), con el objetivo de estudiar la relación que existe entre la actividad de estas enzimas antioxidantes, los niveles de lipoperoxidación y la generación de ERO en este modelo de estudio.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1. CAPTURA Y SELECCIÓN DE MURCIÉLAGOS

Los murciélagos fueron capturados en la localidad conocida como "El túnel", localizada a 10 Kilómetros al este de Tlaxco, Tlaxcala; a 3320 metros sobre el nivel del mar (Figura 3). Para las determinaciones en testículo se capturaron 2 machos adultos mensualmente entre enero del 2003 a mayo del 2004, dando un total de 39; y mediante un muestreo quincenal, un total de 26 machos para los estudios en epidídimo y espermatozoides, entre julio y octubre de los años 2006 y 2007 (León-Galván y col., 2005).

Los murciélagos, siempre fueron capturados antes o en el momento de salir de su refugio, y solo aquellos individuos con características de adultos fueron seleccionados tomando como criterios: pelaje, peso corporal, longitud de antebrazo y condición de sus genitales externos (León-Galván y col. 2005).

Individualmente fueron sexados y pesados usando una balanza electrónica portátil de la marca Ohaus ($\pm 0.01g$), y la longitud del antebrazo fue tomada usando un Vernier ($\pm 0.1mm$).

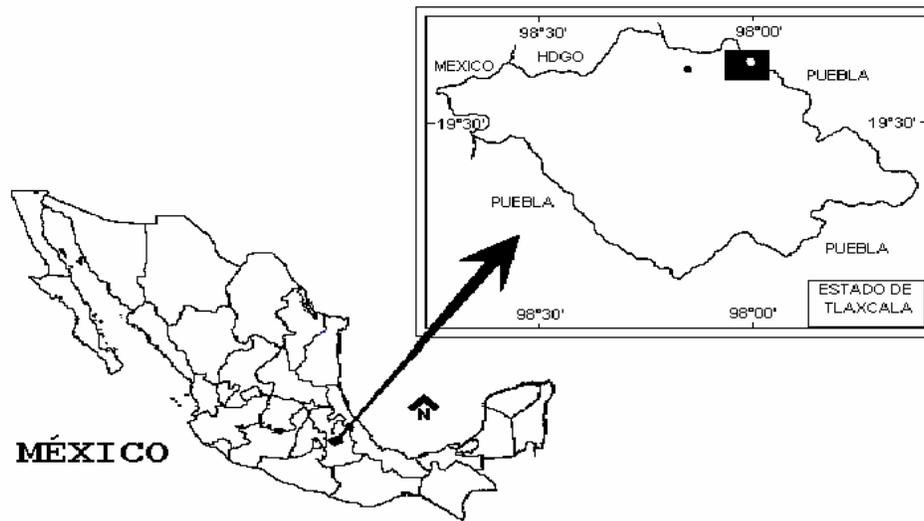


Figura 3. Sitio de colecta de los murciélagos *C. mexicanus*. (Tomado de: López, 1989).

4.2. TRABAJO DE LABORATORIO

4.2.1. MANEJO DE ORGANISMOS Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS

Los animales fueron transportados vivos al laboratorio donde se sacrificaron por decapitación.

Para la obtención de los testículos y los epidídimos, los organismos fueron colocados sobre su dorso, realizando una incisión ventral desde la región terminal del esternón hasta el hueso pélvico para tener acceso amplio al tracto reproductor.

Antes de obtener los epidídimos, éstos fueron ligados, para después ser separados en sus tres regiones gruesas (cabeza, cuerpo y cola), registrando el peso húmedo de cada región. Para cada uno de los testículos se quitó la túnica albugínea y se registró el peso

húmedo. El peso de los órganos y regiones epididimarias fue obtenido utilizando una balanza electrónica marca Metler (con precisión de 0.1 mg).

Después de tomar su peso, los testículos fueron introducidos individualmente en tubos de polipropileno y congelados rápidamente introduciéndolos a un termo con nitrógeno líquido, para posteriormente guardarlos en un ultracongelador, donde fueron preservados a -70° C hasta su uso.

Los epidídimos fueron utilizados inmediatamente después de ser obtenidos.

4.2.2. PREPARACIÓN DE TEJIDOS

4.2.2.1. TESTÍCULOS

Al momento de realizar las determinaciones bioquímicas, los testículos fueron descongelados introduciéndolos en 10 volúmenes de HEPES (1:10 P/V; Apéndice II) previamente enfriada en hielo, donde fueron homogeneizados con un barra de teflón en un homogeneizador glas-col.

Posteriormente el homogeneizado fue precipitado centrifugándolo a una velocidad equivalente a 10, 000 X g, 10 minutos. Solamente el sobrenadante (extracto crudo fuente de enzima) fue empleado para los ensayos.

Debido a las características del ciclo reproductivo masculino del murciélago *C. mexicanus* ya mencionadas, donde se presentan importantes cambios en el tamaño y peso de sus órganos reproductores de manera estacional, y por las necesidades de cubrir con la cantidad de tejido indispensable para la realización de cada una de las técnicas propuestas

para algunas determinaciones, fue necesario reunir los tejidos de diferentes organismos, hecho que fue estipulado con ensayos previos en los que se utilizaron tejidos provenientes de órganos reproductores de ratón.

4.2.2.2. EPIDÍDIMOS

Cada una de las regiones epididimarias fue depositada en cajas Petri de cuatro pozos donde fueron picadas con tijeras utilizando 500µl de un medio estimulante del ovocito (OSM; Apéndice II) previamente calentada hasta alcanzar una temperatura de 37° C, posteriormente la solución OSM+tejido+fluido epididimario+espermatozoides, fue filtrada haciéndola pasar a través de una malla de 98% Nylon/Poliamida, 2% lycra/Elastano, con un diámetro de trama de 20 micras; enjuagándose nuevamente con otros 500µl de OSM (Apéndice II), para así separar el fluido+espermatozoides del tejido epididimario. De la última solución se obtuvo un frotis para verificar presencia de espermatozoides antes de ser separados del fluido epididimario.

Para separar los espermatozoides del fluido epididimario, fueron centrifugados posteriormente a una velocidad equivalente a 500 X g, 5 minutos. Sin embargo, ha sido considerado fluido epididimario hasta después de centrifugar una vez más a una velocidad equivalente a 1700 X g, 10 minutos.

4.2.2.3 ESPERMATOZOIDES

Espermatozoides eyaculados de cerdo de la raza *Large white*, fueron usados como control, ya que se ha demostrado que es altamente susceptible a la actividad de ERO por la lipoperoxidación, para ver si el fluido epididimario del murciélago *C. mexicanus*, hubiese tenido un efecto que lo contrarrestara.

Los eyaculados fueron obtenidos el día de la realización del experimento en la granja “Campoamor” localizada en: General Mariano Ruiz 121, poblado de Cuautlalpan, Texcoco, México. El semen fue transportado al laboratorio dentro de un termo, y una vez en el laboratorio los espermatozoides fueron separados y lavados dos veces usando 2 ml de medio Ringer (Apéndice II) antes de ser centrifugar a una velocidad equivalente a 500 X g, 5 minutos (quedándonos con el botón espermático).

Los espermatozoides de murciélago después de haber sido separados, fueron lavados, una vez, usando el mismo medio usado para los espermatozoides de cerdo, con la diferencia que se usó solamente 1ml.

Después de ser lavados, los espermatozoides fueron resuspendidos en la solución OSM (Apéndice II), antes de determinar su viabilidad y concentración, de acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1987).

Antes de la determinación de la actividad de CAT, SOD y GPX en espermatozoides de murciélago, estas células fueron incubadas en la solución de lisis (Apéndice II) durante una hora a 4° C, antes de centrifugar a una velocidad equivalente a 1000 X g, 5 minutos. Solamente el sobrenadante (fuente de enzima) fue empleado para los ensayos (Bilodeau y col. 2000).

4.2.3. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DE OXÍGENO

El contenido de ERO en espermatozoides fue determinado por citometría de flujo usando ensayos con *Diacetato de diclorodihidrofluoresceína* (DCF; Cathcart y col., 1983; Bass y col., 1983)

Se usaron ocho alícuotas por especie (cerdo *Large white* y murciélago *C. mexicanus*) de 0.5×10^6 espermatozoides en 1 ml de OSM (Apéndice II), en tubos cubiertos de la luz, a las que se les agregó (a excepción del control negativo): 50µl de DCF 32µM.

Para incorporar el DCF fueron incubados 15 minutos en total oscuridad a temperatura ambiente justo antes de centrifugar, con la finalidad de desechar el DCF que no se incorporó a las células, esto a 1500 X g, 5 minutos.

El botón espermático fue resuspendido en 1 ml de OSM, antes de cuantificar la intensidad de fluorescencia en el citómetro de flujo (FACSCalibur: Becton-Dickinson, San Jose, CA), usando una longitud de onda de excitación de 480 nm, y una longitud de onda de emisión de 520 nm, y para el análisis de datos se usó el software CELLQUEST.

Dos alícuotas de cada especie fueron usadas como control negativo (no se les agregó DCF); a dos se les agregó el DCF; otras dos fueron estimuladas con 100µl de NADPH (Apéndice II), 20 minutos antes de cuantificar la intensidad de fluorescencia; y a otras dos se les agregó 100µl de H₂O₂ (Apéndice II). Todo esto en el momento previo para cuantificar la intensidad de fluorescencia.

4.2.4. DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN

La peroxidación lipídica da lugar a la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas plasmáticas en peróxidos lipídicos y aldehídos como el malondialdehído (MDA). En este estudio se determinó la concentración de MDA por un método colorimétrico mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico (Barber y Bernheim, 1967) modificada por Alvarez y Storey (1982).

Para esto, se utilizaron alícuotas de 70×10^6 espermatozoides en una solución de OSM hasta 500 μ l (Apéndice II) que fueron incubados en tubos con tapa de rosca de 2ml perfectamente cerrados para evitar la evaporación de MDA. La reacción se realizó a 35° C durante 24 horas, y las muestras fueron agitadas por inversión cada 30 minutos. La reacción fue detenida cuando las muestras se incubaron a 4° C durante 15 minutos.

Posteriormente, en cada caso se agregaron 125 μ l de ácido tricloroacético (ATC; Apéndice II), a fin de precipitar proteínas, inmediatamente después se centrifugaron las muestras a 1750 X g, 15 minutos para tomar así 375 μ l del sobrenadante que fue depositado en un tubo de ensaye con tapón de rosca, al que se le agregaron además otros 125 μ l de ácido tiobarbitúrico (ATB; Apéndice II). Los tubos fueron tapados, agitados e incubados a ebullición durante 15 minutos; la reacción terminó al ser incubados a 4° C otros 15 minutos, y 15 minutos más a temperatura ambiente. Por último, se cuantificó el producto de la reacción a 532 nm en un espectrofotómetro de luz UV-visible de marca Shimadzu, modelo 1601-PC.

De los espermatozoides de cerdo se hicieron 10 alícuotas, 2 que no se incubaron (usándose como tiempo cero); 8 incubándose a 35° C durante 24 horas (usadas como tiempo final). A 6 de ellas se les agregó 100 μ l de fluido epididimario de murciélago (2

alícuotas con fluido de la región cefálica, 2 con fluido de la región media y 2 con fluido de la región caudal), para determinar si había inhibición (León-Galván, 1997).

De los espermatozoides de murciélago, solo en aquellos casos donde la cantidad de espermatozoides fue suficiente para hacer por lo menos 2 alícuotas (un tiempo cero y un tiempo final) se hizo la determinación. Como solo de la región caudal se obtuvo suficientes espermatozoides, se incluyeron muestras con fluido epididimario de murciélago (región caudal).

Previo a cada determinación, se elaboró una curva de calibración con tetrametoxipropano como estándar. El promedio de la suma de todas las curvas, nos arrojó un valor de R^2 de 0.999, y dado que para el caso de R^2 existe una dependencia funcional lineal cuando esta se acerca a 1, los resultados nos indican que nuestras curvas estándar, fueron confiables.

4.2.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El resultado de la cuantificación de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX fue calculado para cada enzima mediante técnicas particulares previamente descritas y reportado como actividad específica (AE) al ser expresado por unidad de proteínas (Arenas-Ríos y col., 2005).

4.2.5.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA

En la determinación de SOD se empleó xantina y xantina oxidasa (XOD) para la formación de radicales superóxido, y su posterior reacción con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T.), con lo que se forma el colorante formazán rojo. Finalmente el cromógeno formado es cuantificado espectrofotométricamente a 505 nm. En esencia, la técnica de la determinación de SOD está basada en el hecho de registrar la disminución en la formación del cromógeno debido a la eliminación del superóxido por acción de SOD cuya fuente es el sobrenadante utilizado (Arthur y Boyne, 1985).

El sistema de reacción consistió de 25 µl de sobrenadante, fuente de enzima, 850 µl de substrato mixto y 125 µl de XOD, agitando con vortex después de adicionar cada uno de los reactivos, y su posterior cuantificación en el espectrofotómetro. Previo a cada determinación se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar de SOD (soluciones: Apéndice II; sistema de reacción: cuadro 2; Apéndice III)

4.2.5.2. CATALASA

La determinación de CAT fue realizada en un sistema de reacción conteniendo KMnO_4 cuya coloración intensa fue registrada a 480 nm. La base de la técnica consiste en la disminución del color debido a la reacción de peroxidación provocada por H_2O_2 hacia el permanganato de potasio, y el mantenimiento del color en presencia de CAT (Cohen y col., 1970). Para ello, la enzima fue solubilizada y activada en el sobrenadante tratándola en frío con 1 µl de etanol (96%) y 5 minutos con tritón X-100. Posteriormente a esto, las soluciones fueron diluidas 1:5 con HEPES (Apéndice II).

El sistema de reacción estuvo constituido por 100 μl de solución fuente de enzima en 500 μl de H_2O_2 , se agitó en un vortex y se permitió la reacción por 3 minutos a temperatura ambiente (22°C , ± 2) y fue detenida con 100 μl de H_2SO_4 , se agregaron 700 μl de KMnO_4 con agitación y finalmente leída en el espectrofotómetro a 480 nm (soluciones: Apéndice II; sistema de reacción: cuadro 3; Apéndice III).

4.2.5.3. GLUTATIÓN PEROXIDASA

La GPX se determinó por el método de Mills (Paglia y Valentine, 1967), que se basa en la cuantificación espectrofotométrica del glutatión (GSH) a una longitud de onda de 340 nm. El GSH es uno de los componentes del sistema de reacción por medio del cual la GPX en conjunto con la glutatió reductasa (GPX/GR) modulan la amenaza del H_2O_2 convirtiéndolo en agua; por su parte, el GSH es oxidado al disulfuro GSSG. El sistema de reacción también requiere NADPH como donador de protones.

El sistema de reacción consistió de 50 μl de sobrenadante, fuente de enzima, 355 μl de mezcla de reacción; 50 μl de NADPH y 50 μl de H_2O_2 , este último se adicionó después de agitar en Vortex e incubar por 3 minutos a 25°C , por último se leyó a 340 nm (soluciones: Apéndice II; sistema de reacción: cuadro 4; Apéndice III)

4.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos morfológicos registrados para los murciélagos (peso corporal y longitud de antebrazo), los datos de peso húmedo obtenidos del testículo y la AE de las diferentes enzimas determinadas en tejido homogeneizado de testículo, fueron agrupados por mes, y comparados para verificar el patrón de cambios durante el periodo inter-anual.

Los datos morfológicos del epidídimo, el peso húmedo de las diferentes regiones del epidídimo (cabeza y cola), los datos de producción de ERO por espermatozoides epididimarios en los diferentes meses del año, los resultados de inhibición de la lipoperoxidación a espermatozoides de cerdo por fluido epididimario de murciélago, y los resultados de AE de las diferentes enzimas determinadas en espermatozoides y fluido epididimario, fueron agrupados quincenalmente, y comparados para verificar el patrón de cambios durante su ciclo reproductivo.

Las determinaciones de lipoperoxidación en espermatozoides de cerdo y murciélago, fueron comparados entre aquellos con y sin fluido epididimario de murciélago de las diferentes regiones.

Los datos de actividad específica en testículo, fueron comparados mediante la prueba de ANOVA (Sokal y Rohlf 1995) seguida de la prueba de *Bonferroni*. Los resultados que comparan los datos de producción de ERO sin estimular y al estimular con NADPH, fueron analizados realizando una prueba de t para muestras independientes.

Los análisis restantes, fueron comparados mediante una prueba de ANOVA (Sokal y Rohlf 1995), seguida por la prueba de *Tukey*, para identificar las diferencias significativas entre grupos.

Las diferencias entre los distintos grupos fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0.05$.

Los diferentes análisis estadísticos fueron realizados en el programa SPSS[®] 12.0 (SPSS Inc., 2003).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERÍSTICAS SOMÁTICAS DE LOS MURCIÉLAGOS CAPTURADOS

Para las variables somáticas registradas de los murciélagos *C. mexicanus* capturados, encontramos un promedio del peso corporal de: 7.9 gramos \pm 0.6, y de la longitud del antebrazo de: 41.8 milímetros \pm 1.1, presentando características morfológicas de adultos (León-Galván y col., 2005).

5.2. CICLO REPRODUCTIVO

Los órganos reproductores de los murciélagos *C. mexicanus* adultos presentan notables cambios estacionales en su peso y tamaño, indicando que esta especie presenta un solo ciclo reproductivo anual, con una asincronía temporal entre el desarrollo testicular y el epididimario, como sigue:

Los testículos (figura 4) tuvieron durante todo el año una posición inguinal, su peso comienza a aumentar en mayo alcanzando su valor máximo en agosto. Posteriormente los

testículos presentan una profunda involución, alcanzando sus valores más bajos en el mes de noviembre.

El peso del epidídimo completo registrado de murciélagos capturados entre el 31 de julio al 30 de octubre (2006-2007; figura 5), presentó un aumento significativo a finales de agosto, alcanzando sus valores más altos en el mes de septiembre y aun cuando a finales del mes de octubre se observan valores altos en el peso, no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al peso inicial registrado. Después de separar el epidídimo en sus tres regiones, observamos que existe una clara asincronía entre las regiones del epidídimo, alcanzando la cabeza del epidídimo su máximo desarrollo a principios de septiembre, mientras que en la región caudal, los valores más altos registrados son los observados en el mes de agosto, manteniéndose altos hasta el mes de octubre. El cuerpo del epidídimo no presentó cambios estadísticamente significativos ($F=1.966$; $P>0.05$). La involución en la cabeza del epidídimo ocurre al menos un mes antes que la regresión en la cola del epidídimo.

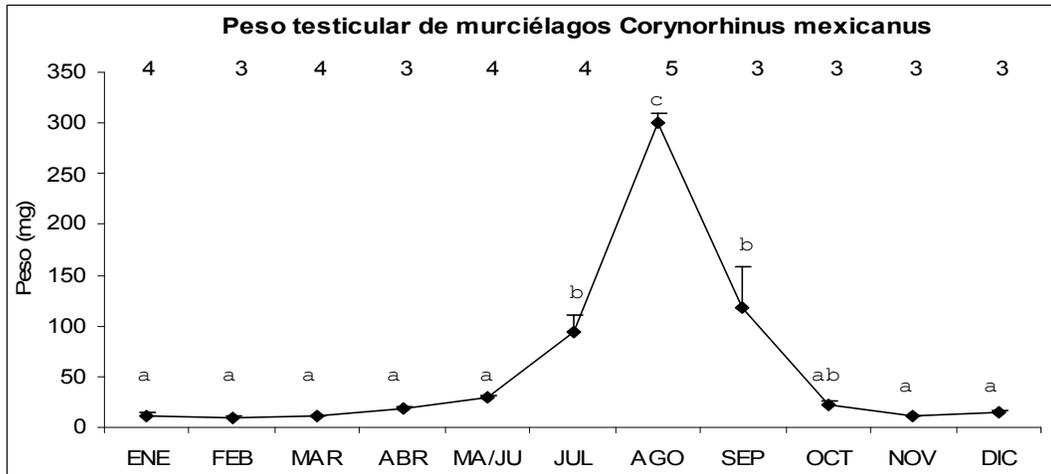


Figura 4 Peso testicular (mg) de murciélagos *C. mexicanus* adultos, capturados de enero (2003) a mayo (2004). Los puntos indican el promedio \pm DS del peso por cada órgano. Los números en la parte superior de la gráfica indican el número de murciélagos utilizados. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, Tukey; $P < 0.05$).

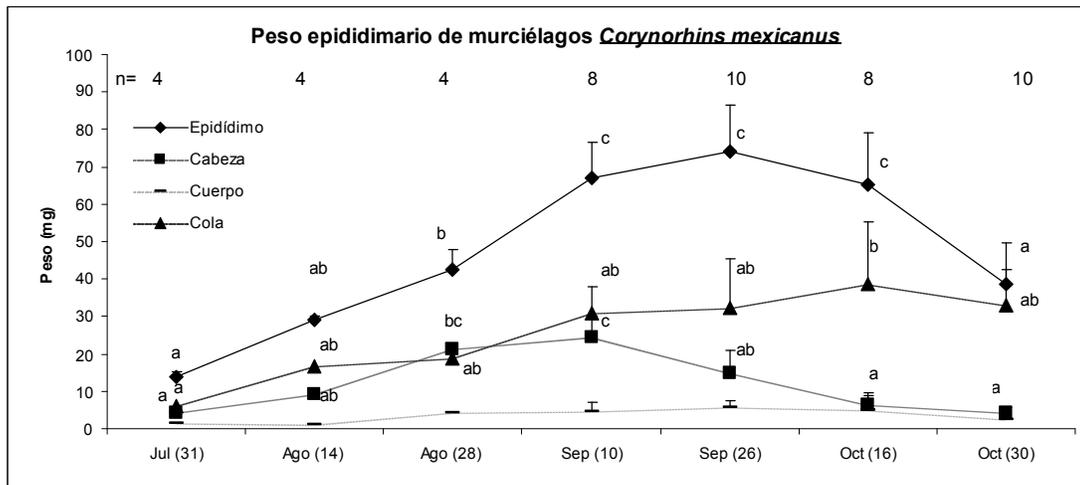


Figura 5 Peso epididimario (mg) de murciélagos *C. mexicanus* adultos, capturados de finales de julio a finales de octubre (2006-2007). Los puntos indican el promedio \pm DS. Los números en la parte superior de la gráfica indican el número de órganos utilizados. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, Tukey; $P < 0.05$).

El patrón observado en el murciélago *C. mexicanus* es similar a lo descrito para los murciélagos vespertilionidos y rhinolofidos que habitan en zonas templadas y húmedas (Gustafson, 1979; Krutzsch, 2000; Racey y Entwistle, 2000), presentando un solo ciclo reproductivo anual, con una asincronía temporal entre las funciones reproductivas primarias y las secundarias. Además se observa en su ciclo reproductivo la clara diferenciación de varias etapas anuales, las cuales van desde la inactividad reproductiva, el apareamiento y el paso a través de un periodo de almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo.

El desarrollo testicular comenzó en mayo alcanzando su peso máximo en el mes de agosto, y regresando a sus valores más bajos en el mes de octubre. Estos cambios también han sido reportados en otras especies de murciélagos (Racey, 1974; Racey y Tam, 1974). Por otro lado, en los organismos analizados, los testículos se observaron en posición inguinal, indicando que no se presenta la migración hacia el abdomen de los testículos en etapa de inactividad reproductiva (Bathgate y col., 2002).

De acuerdo con los datos de morfología testicular en el murciélago *C. mexicanus*, la información histológica reportada (López, 1989; León-Galván, 2008) indican, que en el periodo de noviembre a abril, es decir en la etapa en que los testículos presentan sus valores más bajos en peso, los testículos no presentan actividad espermatogénica, los túbulos seminíferos se encuentran involucionados y las células de Sertoli fueron notablemente disminuidas en número y algunas muestran degeneración vacuolar.

El máximo desarrollo de los epidídimos en el murciélago *C. mexicanus* se presenta en el mes de septiembre, un mes después de que el testículo alcanza sus valores más altos, sin embargo, la reducción del tamaño en los epidídimos se observa de manera gradual desde diciembre a febrero, observándose un gran desarrollo en la región caudal del

epidídimo, siendo evidente desde septiembre y manteniéndose hasta el mes de enero, para lo cual León-Galván y colaboradores (2005), proponen que el aumento en el tamaño del epidídimo, así como, el abundante sistema venoso del plexo pampiniforme (Cooper, 1999) y la ausencia de pelo en esa área, podría funcionar como un importante dispositivo de enfriamiento y participar como parte de los mecanismos de protección de los espermatozoides en el largo periodo de almacenamiento espermático, que junto con la participación de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX podrían estar modulando la producción de ERO (Arenas-Ríos y col., 2005).

5.3. REGISTRO DE PRESENCIA Y CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDÍDIMARIOS

El primer registro de presencia de espermatozoides en el epidídimo de murciélagos *C. mexicanus* (figura 6) se observó a finales del mes de agosto, y se continuó observando presencia de espermatozoides hasta finales del mes de octubre (última fecha de registro), y aun cuando en la región cefálica se observó una clara reducción en la concentración espermática a finales de octubre, y en la región caudal una clara tendencia a aumentar; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de espermatozoides obtenidas, en los diferentes meses, en estas regiones (ANOVA; cabeza: $F=3.471$, $P>0.05$; cola: $F=2.453$, $P>0.05$). Sin embargo, en la región del cuerpo del epidídimo se presentó un aumento significativo de la concentración espermática, entre el mes de agosto y el mes de septiembre, misma que se mantiene a principios del mes de octubre, registrándose una clara disminución en la concentración espermática a finales de octubre (figura 6).

La recuperación de los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo, indican que el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo del murciélago *C. mexicanus* fue rápido, confirmando lo publicado por Cervantes y colaboradores (2008), donde además mencionan que, el número de espermatozoides en la región cefálica y en el cuerpo fue siempre bajo, con respecto a lo encontrado en la región caudal del epidídimo. En el presente trabajo obtenemos datos similares, donde, en la región cefálica y en el cuerpo del epidídimo, la concentración de espermatozoides no excede nunca los 40 millones de espermatozoides, sin embargo, en la región caudal del epidídimo aún en los primeros registros la concentración fue ya de [44-143 millones], alcanzando hasta [79-646 millones] a finales de octubre, y en la región cefálica y en el cuerpo, la concentración espermática disminuye casi hasta desaparecer, mientras que en la región caudal, es justo en esta fecha, cuando se presentan las concentraciones espermáticas más altas registradas.

León-Galván y colaboradores (1999), hacen referencia a las características morfológicas de la región caudal del epidídimo del murciélago *C. mexicanus*, donde mencionan, que, cuando el epidídimo presenta los valores más bajos de desarrollo, ésta, se observa aplanada, misma que, toma una apariencia bulbosa durante el otoño cuando el epidídimo podría haberse llenado con espermatozoides; lo cual coincide con los datos obtenidos en éste trabajo, confirmando que el cambio de forma en la región caudal del epidídimo (de aplanada a bulbosa), así como el aumento del peso en ésta región (figura 5), guarda una relación directa con el incremento en la concentración de espermatozoides.

Los túbulos epididimarios del murciélago *C. mexicanus* se encuentran casi vacíos en febrero, marzo y abril y saturados de espermatozoides a más tardar en noviembre, diciembre y enero (López, 1989; León-Galván y col., 1999; Cervantes y col., 2008), los datos obtenidos en el presente trabajo sostienen lo publicado en los anteriores reportes, y

confirman la existencia de un almacenamiento prolongado de espermatozoides en la región caudal del epidídimo del murciélago *C. mexicanus* durante otoño e invierno temprano.

Por lo tanto, el almacenamiento espermático en ésta especie, como en algunos murciélagos vespertilionidos y rhinolofidos, coincide con la estación fría, durante la cual los murciélagos batallan con las condiciones climáticas adversas, ya sea hibernando, algunas especies u otras, presentando torpor diario como el caso del murciélago *C. mexicanus*.

Se ha reportado que la espermatogénesis no sucede cuando los organismos se encuentran en torpor (Entwistle y col., 1998), por consiguiente, el almacenamiento prolongado de espermatozoides permite que en los machos se lleve a cabo una asincronía entre sus funciones reproductivas (Racey y Entwistle 2000).

La espermatogénesis toma lugar durante la estación del año más favorable, en términos de características climáticas y disponibilidad de recursos, mientras que la actividad de las glándulas accesorias y la cópula toma lugar en otoño, asegurando los nacimientos en tiempo para permitir a los individuos jóvenes; aprender a volar, desarrollarse y almacenar grasa, antes de la siguiente estación fría.

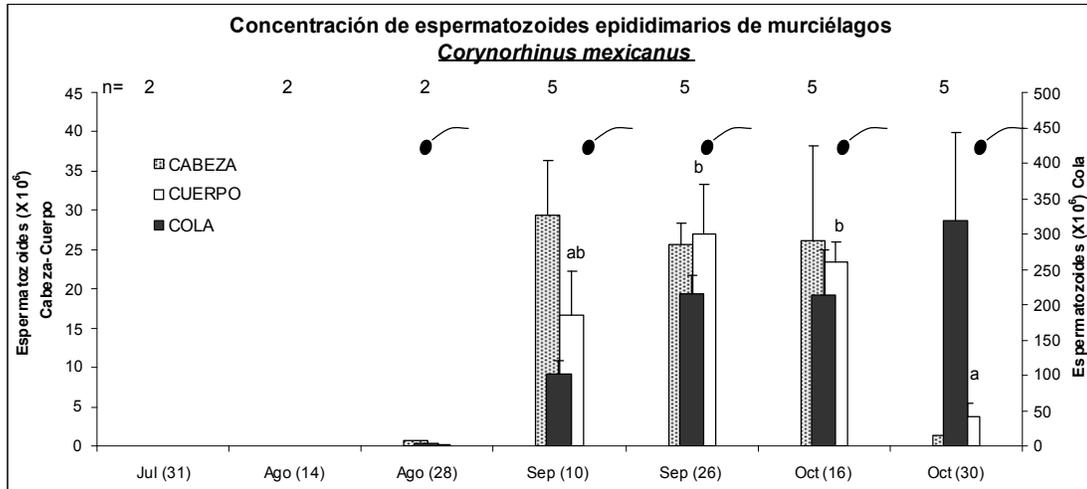


Figura 6 Presencia y concentración de espermatozoides epididimarios (en millones; lado izquierdo: concentración en cabeza (▨) y cuerpo (□); lado derecho: concentración en cola del epidídimo (■)) de murciélagos *C. mexicanus* adultos, capturados de finales de julio a finales de octubre (2006-2007). Las barras indican el promedio \pm DS. Los números en la parte superior de la gráfica indican el número de murciélagos utilizados por fecha de captura. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, seguido de prueba deTukey).

5.4. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DE OXÍGENO

Muchos reportes que han surgido sobre la generación de ERO por espermatozoides han sido respaldados con la detección de altos niveles de quimioluminiscencia, usando para esto, luminol o lucigenina. Sin embargo, se ha observado que éstas técnicas presentan problemas de interferencia en la determinación, dando así evidencias no definitivas (Baker y Aitken, 2005).

El uso del luminol ha sido usado para demostrar la producción de ERO por espermatozoides de pacientes infértiles y en espermatozoides con retención de citoplasma residual (Gómez y col., 1996; Gil-Guzman y col., 2001; Ollero y col., 2001). Sin embargo,

esta técnica que detecta la producción de ERO mediante la síntesis de ácido hipocloroso (HOCl), a partir de H_2O_2 y cloro (reacción catalizada por la mieloperoxidasa), también puede ser oxidada por OH^\cdot y ácido peroxinitroso (ONOOH).

Por su parte, la lucigenina ha sido usada exitosamente para determinar $O_2^{\cdot-}$ en espermatozoides de rata obtenidos de la región caudal del epidídimo, señal que mostró ser de origen mitocondrial y que fue inhibida por la SOD (Vernet y col., 2001).

Al adicionar NADPH/lucigenina a espermatozoides de humano, ratón y rata, demostraron que ésta quimioluminiscencia es dependiente de una actividad redox (Aitken y col. 1997; Fisher y Aitken 1997; Vernet y col. 2001), y en el caso de los espermatozoides humanos, la quimioluminiscencia dependiente de NADPH fue de origen no mitocondrial (Aitken y col. 1997). Éstos resultados fueron justificados con la presencia de una NADPH oxidasa que podría ser responsable de los altos niveles de quimioluminiscencia inducida por NADPH (de Lamirande y Gagnon 1993a).

Sin embargo Baker y Aitken (2005) propusieron que se trata de enzimas semejantes al citocromo P450, las responsables de la quimiluminiscencia inducida por NADPH, debido a que, la reducción de la lucigenina bajo la influencia de estas enzimas y NADPH, generarían especies LH^+ , y a su vez, la reacción entre LH^+ y el O_2 , darían origen al $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, para reciclar la lucigenina a su estado nativo, se requiere $O_2^{\cdot-}$ en la reacción de oxigenación con LH^+ , y finalmente, la reacción entre LH^+ y $O_2^{\cdot-}$ para la generación de quimiluminiscencia.

Como consecuencia, la quimiluminiscencia del $O_2^{\cdot-}$ sensible a SOD, puede ser generada en sistemas celulares que no generan ellos mismos ERO, pero capaces de dar positivo en la prueba de lucigenina (Baker y Aitken, 2005), por tal motivo, los datos obtenidos con esta prueba deberán ser interpretados con precaución.

De tal modo, las nuevas investigaciones que determinan la producción de ERO, utilizarían técnicas más confiables para su evaluación, como la determinación de fluorescencia por citometría de flujo (Holthe y col., 2004; López-Diazguerrero y col., 2005a, b). Técnica que usamos en el presente trabajo.

La técnica determina los niveles intracelulares de H_2O_2 y otros peróxidos, mismos que fueron cuantificados con el citómetro de flujo para medir la fluorescencia de las células con DCF al ser oxidada por las ERO antes mencionadas. De ese modo, la fluorescencia obtenida fue directamente proporcional a la concentración de ERO, que para su determinación, primeramente fue seleccionado el tipo celular (en este caso espermatozoides), de la siguiente manera:

El análisis presentó un eje de coordenadas X/Y, las poblaciones celulares fueron representadas por agrupaciones de puntos situándose en los citogramas dependiendo de su tamaño y de su complejidad interna, es decir, las células colocadas más a la derecha eran más grandes que las situadas a la izquierda (eje X), y las células situadas más arriba eran las más complejas con respecto a las situadas más abajo (eje Y), de este modo nos quedamos con la región que correspondía al tamaño y características de los espermatozoides.

Posterior a esto se hizo la estimación de fluorescencia, y de éste modo el citómetro discriminó la fluorescencia producto de restos celulares y de otros tipos celulares que no fueran espermatozoides.

Los datos fueron normalizados para su representación gráfica, como intensidad de fluorescencia (IF)= (intensidad de fluorescencia media) (% entrada de eventos), reportada anteriormente por López-Diazguerrero y colaboradores (2005).

En la figura 9A se presentan los resultados de comparar la producción de ERO de espermatozoides de murciélago *C. mexicanus* (epididimarios: región cefálica y caudal) y espermatozoides de cerdo (eyaculado), donde, a pesar de que la producción de ERO se observa claramente como sigue: cerdo>cabeza>cola; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre éstos (ANOVA; figura 9A: $F=0.658$, $P<0.05$; figura 9B: $F=0.413$, $P<0.05$).

Al estimular la producción de ERO agregando NADPH (Figura 9B), encontramos que tampoco existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos a los que no se les agregó NADPH (ANOVA; cerdo : $F=0.06$; cabeza : $F=0.051$; cola : 0.038 , $P<0.05$)., de acuerdo con esto podemos decir, que, la producción de ERO no fue estimulada con NADPH, ni en los espermatozoides de cerdo, ni en espermatozoides de murciélago, tampoco encontrando diferencias estadísticamente significativas entre la producción de ERO de espermatozoides de murciélago *C. mexicanus* (epididimarios: región cefálica y caudal) y de espermatozoides de cerdo (ANOVA; eyaculado; $F=0.413$, $P>0.05$).

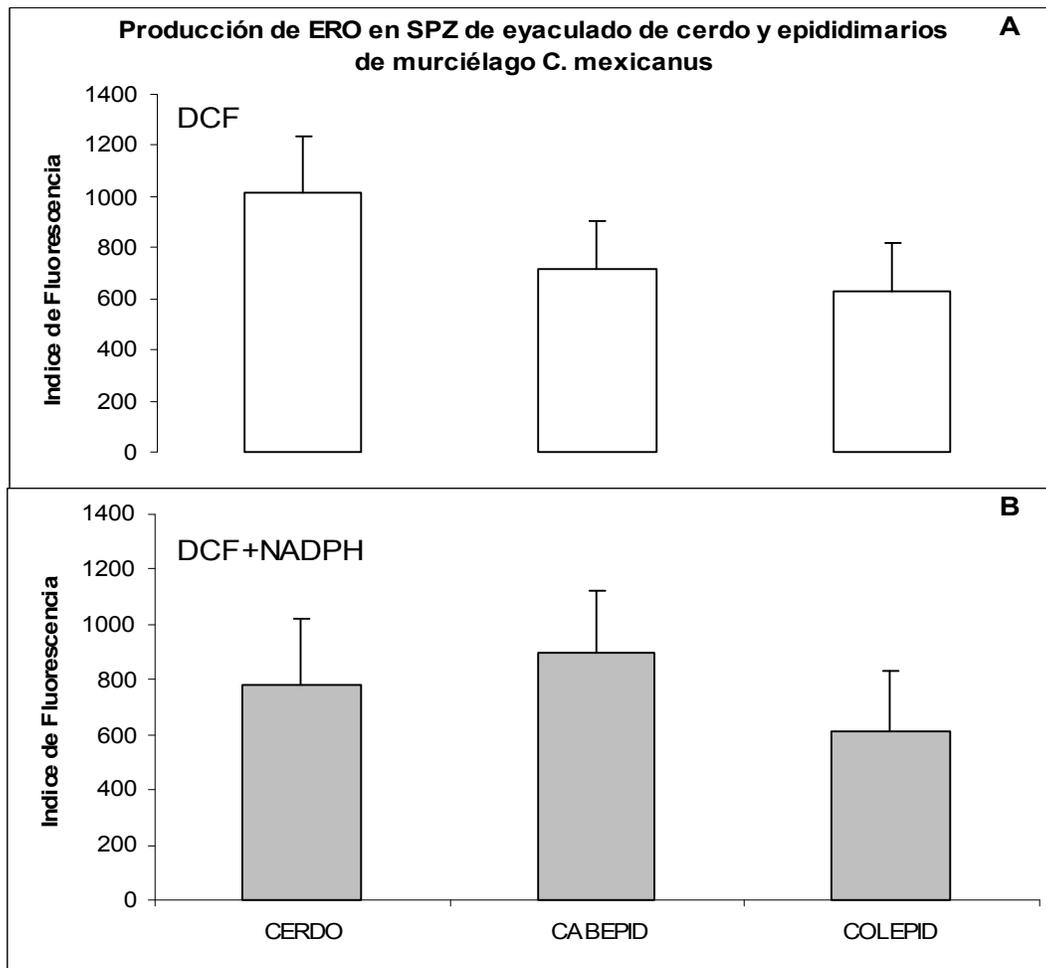


Figura 8 Determinación de ERO en espermatozoides de eyaculado de cerdo y epididimarios de murciélago *C. mexicanus*. La gráfica **A**, muestra los resultados de ERO solo con DCF y la gráfica **B**, los resultados de ERO con DCF+NADPH.

Las barras representan el promedio \pm ES.

No hay diferencias estadísticamente significativas ni entre especies y ni entre regiones (ANOVA; A: $F=0.658$; B: $F=0.413$, $P>0.05$).

No hay cambios estadísticamente significativas en la producción de ERO al agregar NADPH al sistema (ANOVA; cerdo: $F=0.06$; cabeza: $F=0.051$; cola: 0.038 , $P<0.05$).

Cuando se comparan los datos de producción de ERO por espermatozoides epididimarios del murciélago *C. mexicanus* (región cefálica (figura 9A) y caudal (figura 9B)) entre las diferentes fechas de captura, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de ERO entre las diferentes fechas (cabeza: $F=1.193$, $P>0.05$; cola: $F= 1.780$, $P>0.05$); sin embargo, se observa una clara tendencia a aumentar ésta producción a mediados de septiembre, alcanzando sus valores más altos a mediados de octubre y manteniéndose altos hasta finales del mismo mes, siendo ésta la última fecha de captura. Al estimular la producción de ERO agregando NADPH (región cefálica (figura 9A) y caudal (figura 9B)), tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas (cabeza: $F=0.751$, $P>0.05$; cola: $F= 1.377$, $P>0.05$). No obstante, también encontramos una clara tendencia a aumentar ésta producción a finales de septiembre, alcanzando sus valores más altos a mediados de octubre y manteniéndose altos hasta finales del mismo mes.

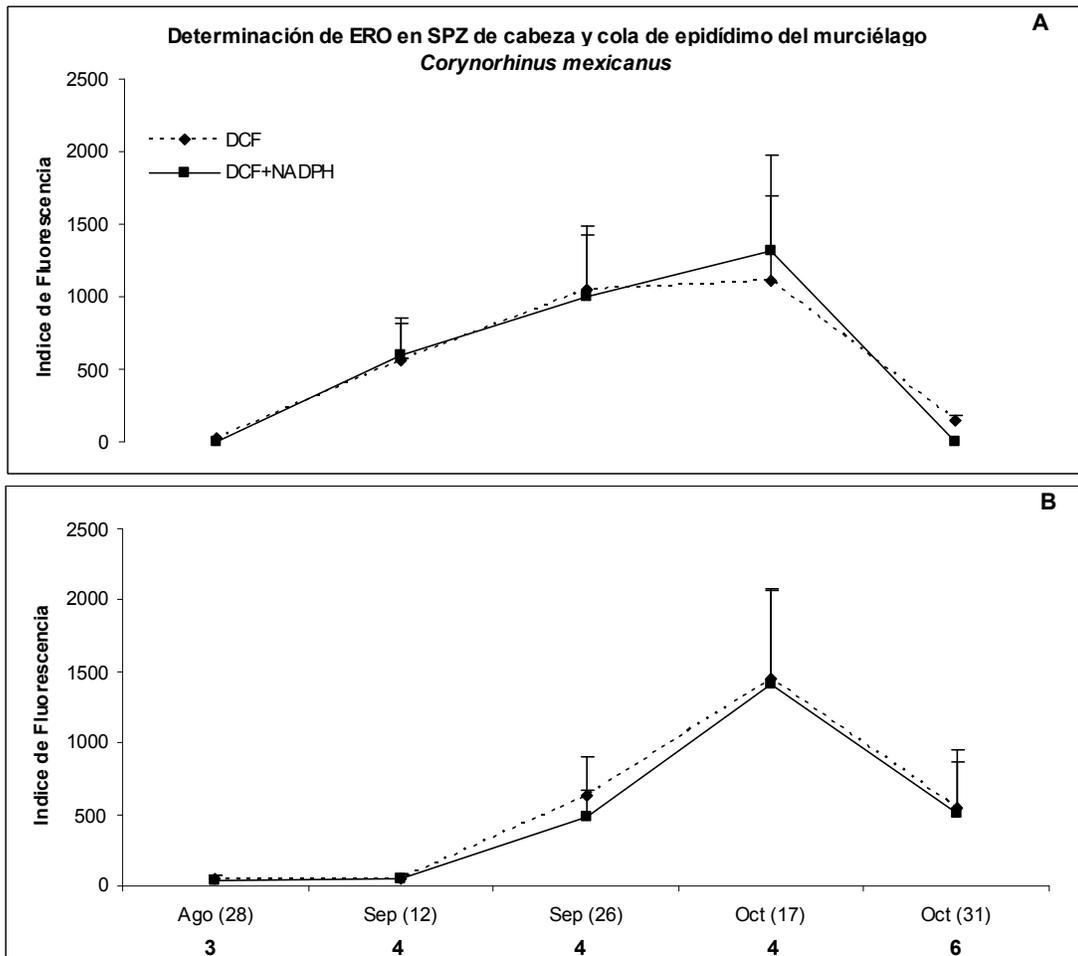


Figura 9 Determinación de ERO en espermatozoides epididimarios de: A) cabeza y B) cola, tomados de murciélagos *C. mexicanus* entre finales de agosto y finales de octubre. Los puntos representan el promedio \pm ES.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni entre las ERO producidas únicamente con DCF (ANOVA; cabeza: $F=1.193$; $P>0.05$; cola: $F=1.780$; $P>0.05$), ni entre las ERO producidas con DCF+NADPH (ANOVA; cabeza: $F=0.751$; $P>0.05$; cola: $F=1.377$; $P>0.05$). Los números en la parte inferior de la gráfica indican el número de determinaciones por fecha.

El proceso de maduración espermática que entre otras cosas involucra: la capacidad para moverse, el termino de la condensación nuclear, así como los cambios en la distribución de moléculas de superficie (Cooper, 1995; Moore, 1996), se lleva a cabo, comúnmente, antes de que los espermatozoides alcancen la región caudal del epidídimo (revisado por: Robaire y col., 2006). Se ha propuesto que en éste proceso, las ERO podrían estar involucradas; como es el caso particular del $O_2^{\cdot-}$, que estimula indirectamente la actividad de cinasa para tirosina, debido a un aumento en la concentración del AMPc, no así, el H_2O_2 que la estimula directamente, inhibiendo además, la fosfatasa para tirosina (Aitken, 2000; Lewis y Aitken, 2001).

Esto ha sido ampliamente comprobado en espermatozoides de humano (de Lamirande y Gagnon, 1998). Sin embargo, se ha visto que en espermatozoides de toro, 50 mmol/l de H_2O_2 incrementa la concentración del AMPc por estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa, y a su vez, un incremento en la fosforilación de tirosina.

La producción de ERO en los espermatozoides epididimarios del murciélago *C. mexicanus* (figura 9), nos indica, de acuerdo a lo citado anteriormente, que, podrían estar participando en el proceso de maduración de los espermatozoides en la región cefálica del epidídimo (figura 9A). Sin embargo, la producción de ERO persiste en los espermatozoides obtenidos de la región caudal (figura 9B), aún en fechas cercanas a que se lleve a cabo la cópula (López, 1989). Esto podría confirmar lo reportado por Cervantes y colaboradores (2008), quienes determinaron que, persiste un alto porcentaje de espermatozoides con gota citoplásmica al llegar a la región caudal, además de un bajo índice de capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides obtenidos del cuerpo, que incrementan significativamente durante su estancia en la cola; revelando que, el proceso de

maduración espermática en el murciélago *C. mexicanus*, a diferencia de lo reportado en otras especies de mamíferos, se completa en la región caudal.

Al no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos de la producción de ERO en espermatozoides epididimarios del murciélago *C. mexicanus*, independientemente, de ser o no estimulados con NADPH (figura 9), podemos sostener, que la producción de ERO no depende de la actividad de una NADPH oxidasa, como había sido planteado por diversos investigadores (Aitken y col., 1997; Griveau y LeLannou, 1997; Aitken y col., 1998a; Twigg y col., 1998a, b; Aitken y col., 2003), pues la NADPH oxidasa parece o estar inactiva o ausente, lo cual fortalece lo reportado por Banfi y colaboradores (2004), quienes encontraron que el gen de la NADPH oxidasa, miembro de la familia NOX5, es expresado en espermatoцитos primarios de humanos, pero, no fue confirmada en espermatozoides maduros. Además de lo reportado por Shukla y colaboradores (2005), quienes postulan, que esta oxidasa alcanza su actividad máxima en espermatozoides testiculares, pero disminuye gradualmente conforme avanza la maduración espermática, pues aparentemente, la NADPH oxidasa se encuentra ausente en espermatozoides epididimarios, por lo que la actividad de la NADPH oxidasa, relacionada anteriormente, con la producción de ERO por espermatozoides epididimarios, podría deberse en realidad a la actividad de la citocromo-B5 reductasa localizada en células epiteliales, que pudieran haber contaminado la suspensión espermática (Baker y col., 2004; Baker y col., 2005).

Por tal motivo podemos sostener, que la producción de ERO por los espermatozoides epididimarios del murciélago *C. mexicanus* podría tener su origen en la actividad mitocondrial (Ford, 2004), o habría que confirmar, si ésta producción se debe a la actividad de DUOX, según lo reportado recientemente (Baker y col., 2007).

5.5. DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN

Para la determinación de lipoperoxidación en espermatozoides epididimarios del murciélago *C. mexicanus*, se usaron espermatozoides de cerdo como control (figura 10), mismos a los que se agregó fluido epididimario del murciélago *C. mexicanus* (de sus tres principales regiones: cabeza, cuerpo y cola), para ver si éste la inhibía.

Sin embargo, la lipoperoxidación en espermatozoides de cerdo, contrario a lo que se esperaba, aumentó al agregarseles fluido epididimario del murciélago, no así a espermatozoides de murciélago, pues aún cuando no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA; $F= 0.463$, $P>0.05$), se observa que la lipoperoxidación tiene una clara tendencia a ser disminuida.

Como se menciona en la metodología, se hizo un muestreo quincenal (de finales de julio a finales de octubre), de donde se obtuvieron espermatozoides (insuficientes para la determinación de la lipoperoxidación) y fluido epididimario, de ese modo se usaron espermatozoides de cerdo a los que se les determino la lipoperoxidación agregando fluido epididimario de murciélago *C. mexicanus*. Al comparar los cambios entre las diferentes fechas de captura (figura 11), obtuvimos lo siguiente: un aumento en la lipoperoxidación a mediados de septiembre para espermatozoides de cerdo con fluido epididimario de cabeza; a finales de agosto para espermatozoides con fluido de cuerpo; y a mediados de octubre para espermatozoides con fluido de cola. No obstante, la lipoperoxidación disminuye en espermatozoides con fluido de cabeza a mediados de octubre, sin embargo, para finales de octubre (fin de la fecha de captura), los valores en espermatozoides con fluido del cuerpo y cola, aun no disminuyen significativamente.

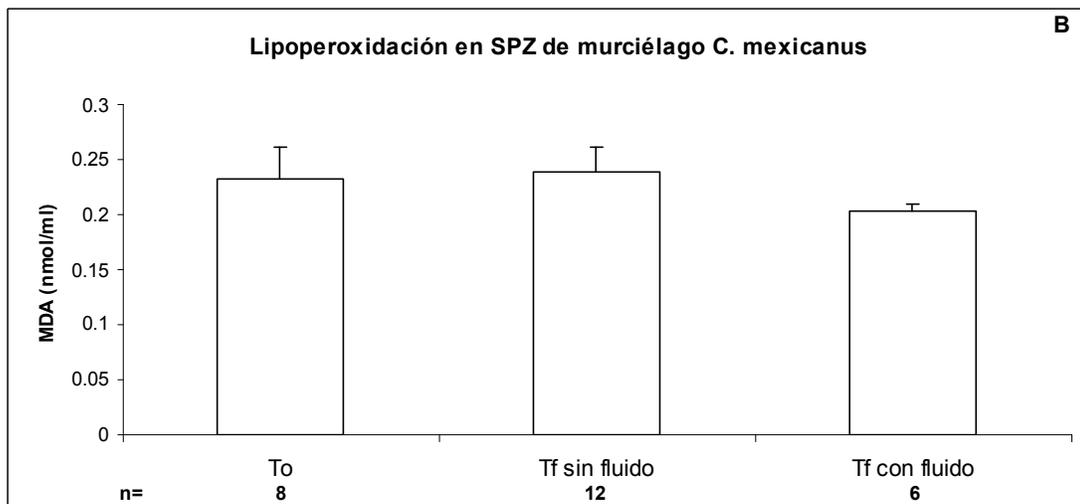
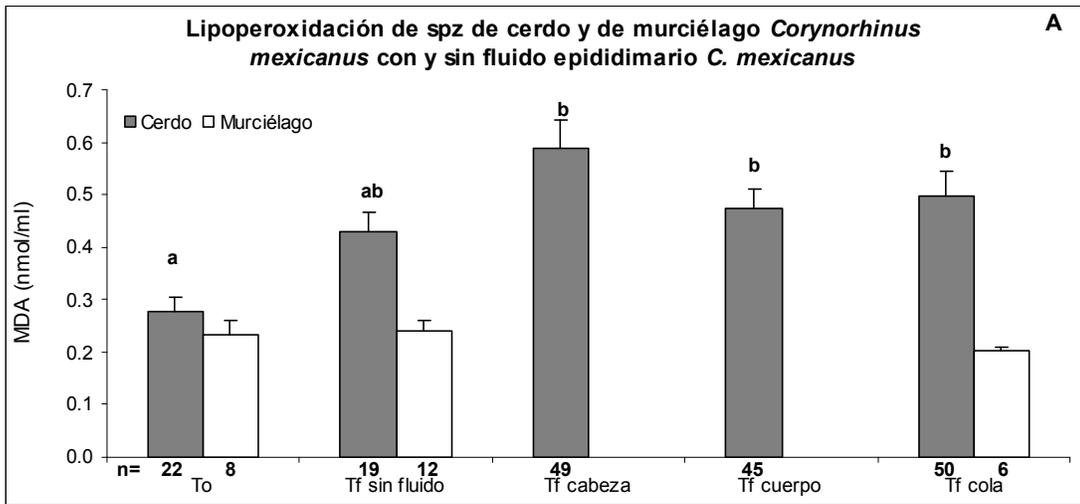


Figura 10 Determinación de liperoxidación (A: espermatozoides de cerdo y de murciélagos *C. mexicanus* adultos tomados de finales de agosto a finales de octubre (2006-2007); B: espermatozoides de murciélagos). Las barras representan el promedio \pm DS. Los números en la parte inferior de las gráficas indican el número de determinaciones.

A) Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, seguido de prueba de Tukey).

B) No hay diferencias estadísticamente significativas ($F=0.463$, $P<0.05$).

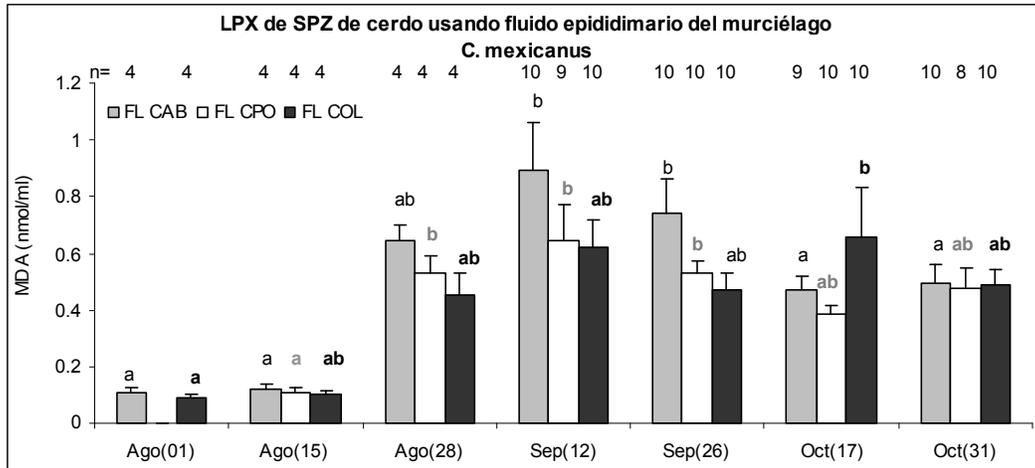


Figura 11 Determinación de lipoperoxidación expresada por la cantidad nmol de MDA producido por 70×10^6 espermatozoides de cerdo, usando fluido epididimario de murciélagos *C. mexicanus* adultos capturados de finales de agosto a finales de octubre (2006-2007).

Las barras representan el promedio \pm DS. Los números en la parte superior de las gráficas indican el número de determinaciones por fecha, por variable.

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, seguido de prueba de Tukey).

Estos resultados indican que la lipoperoxidación.

Aunque en diferentes reportes se ha mostrado que la lipoperoxidación parece ser una de las principales causas de pérdida de movilidad espermática, y así, la privación de su capacidad fertilizante y la muerte de éstas células (Jones y Mann 1979; Aitken y Clarkson 1987), el único reporte donde determinan la lipoperoxidación en espermatozoides de murciélago, fué publicado hace diez años (León-Galván y col., 1999), en espermatozoides obtenidos del útero, donde las hembras almacenan éstas células.

Sin embargo, se ha visto que al igual que en el murciélago *Scotophilus heathi* (Krishna y Singh 1997), en el murciélago *C. mexicanus*, nunca fueron encontrados leucocitos en el lúmen uterino, ya que los leucocitos son agentes muy activos en la liberación de ERO y en la inducción de la lipoperoxidación en espermatozoides (Aitken y West 1990; Plante y col. 1994). Esto resulta sumamente interesante porque diversos reportes indican que los niveles excesivos de ERO generados por la contaminación de

leucocitos y por los mismos espermatozoides, inducen un incremento en la lipoperoxidación de lípidos en espermatozoides, y juegan un importante papel en la infertilidad masculina (Iwasaki y Gagnon 1992; Shekarriz y col. 1995).

En el presente trabajo se encuentra una importante actividad de lipoperoxidación en espermatozoides lavados del epidídimo del murciélago *C. mexicanus*. Estos resultados indican que la lipoperoxidación expresada por la cantidad de MDA producido por 70×10^6 espermatozoides fue de: 0.10 ± 0.30 nmol de MDA; durante 22 horas. Datos que resultan similares a lo encontrado por León-Galván y colaboradores (1999) en espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo del murciélago *C. mexicanus* capturados durante noviembre y diciembre, y similar también, con lo reportado para espermatozoides humanos (Aitken y col. 1989), pero menor, que lo publicado para espermatozoides de conejo y espermatozoides de cerdo (Alvarez y Storey 1982). Sin embargo, esta producción de MDA es suficiente para provocar una completa inmovilización de 10^8 espermatozoides, en menos de 20 horas (Alvarez y Storey 1982).

A pesar de lo reportado sobre la inhibición de la lipoperoxidación en espermatozoides de cerdo y murciélago, al agregarles fluido genital femenino (de tres a cinco veces; León-Galván y col., 1999), esto no sucedió al añadirles fluido epididimario, ya que, contrario a lo que se esperaba, en espermatozoides de cerdo la lipoperoxidación se vio incrementada (figura 10A).

Lo cual podría justificarse con lo reportado para espermatozoides epididimarios de rata, donde sugieren que la producción de ERO no es resultado de la actividad de la NADPH oxidasa, como se había propuesto anteriormente (Aitken y col., 1992; Aitken y col., 1994; Gómez y col., 1996), sino que podría ser producto de la actividad de la citocromo-B5 reductasa localizada en células epiteliales, que estén contaminado la

suspensión espermática (Baker y col., 2004; Baker y col., 2005). Pues aun cuando al agregarle fluido epididimario a los espermatozoides del murciélago *C. mexicanus* (figura 10B) se encuentra una tendencia a inhibir la lipoperoxidación, no fueron encontradas diferencias, estadísticamente significativas.

La presencia de inhibidores efectivos para la lipoperoxidación en el almacenamiento prolongado de espermatozoides, proceso que se encuentra en el murciélago *C. mexicanus*, primero en el epidídimo y después en el tracto genital femenino (León-Galván y col., 1999; León-Galván y col., 2005; Arenas-Ríos y col., 2005), pueden ser muy importantes para mantener la viabilidad y la movilidad de los espermatozoides (De Lamirande y Gagnon 1993b, 1995; Crichton y col. 1993), y dado que, se ha mostrado que en espermatozoides humanos (Griveau y col. 1995) el H_2O_2 puede ser la molécula principalmente responsable, de los efectos dañinos causados por ERO en las membranas de los espermatozoides, la presencia de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el epidídimo del murciélago *C. mexicanus* (Arenas-Ríos y col., 2005), pudieran estar desempeñando ésta función.

5.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS

ANTIOXIDANTES

5.6.1. TESTÍCULO

La figura 11 muestra los cambios en la actividad específica (actividad por miligramo de proteína) de las enzimas antioxidantes: SOD (figura 11A), CAT (figura 11B) y GPX (figura 11C); durante el ciclo anual del murciélago *C. mexicanus*.

Donde encontramos que la actividad de la SOD resulta baja en los meses de septiembre a febrero, aumentando de marzo a julio (meses en que los testículos muestran una clara regresión testicular), y observándose una sostenida disminución de la actividad en el mes de agosto (mes de máximo desarrollo testicular), quedando la actividad de ésta enzima de 3 a 4 veces menor que en julio.

La actividad de CAT varía enormemente, pareciendo especialmente importante durante el periodo de regresión testicular, pues encontrando los valores más altos de actividad en los meses de noviembre a enero, y los valores más bajos durante el periodo de máximo desarrollo testicular. Un patrón similar es encontrado en la actividad de GPX, aunque menos variable, alcanzando sus valores más bajos de marzo a julio, durante los meses de recrudescencia testicular, incrementando en el mes de agosto y alcanzando sus valores más altos en noviembre, disminuyendo lentamente hasta el mes de marzo.

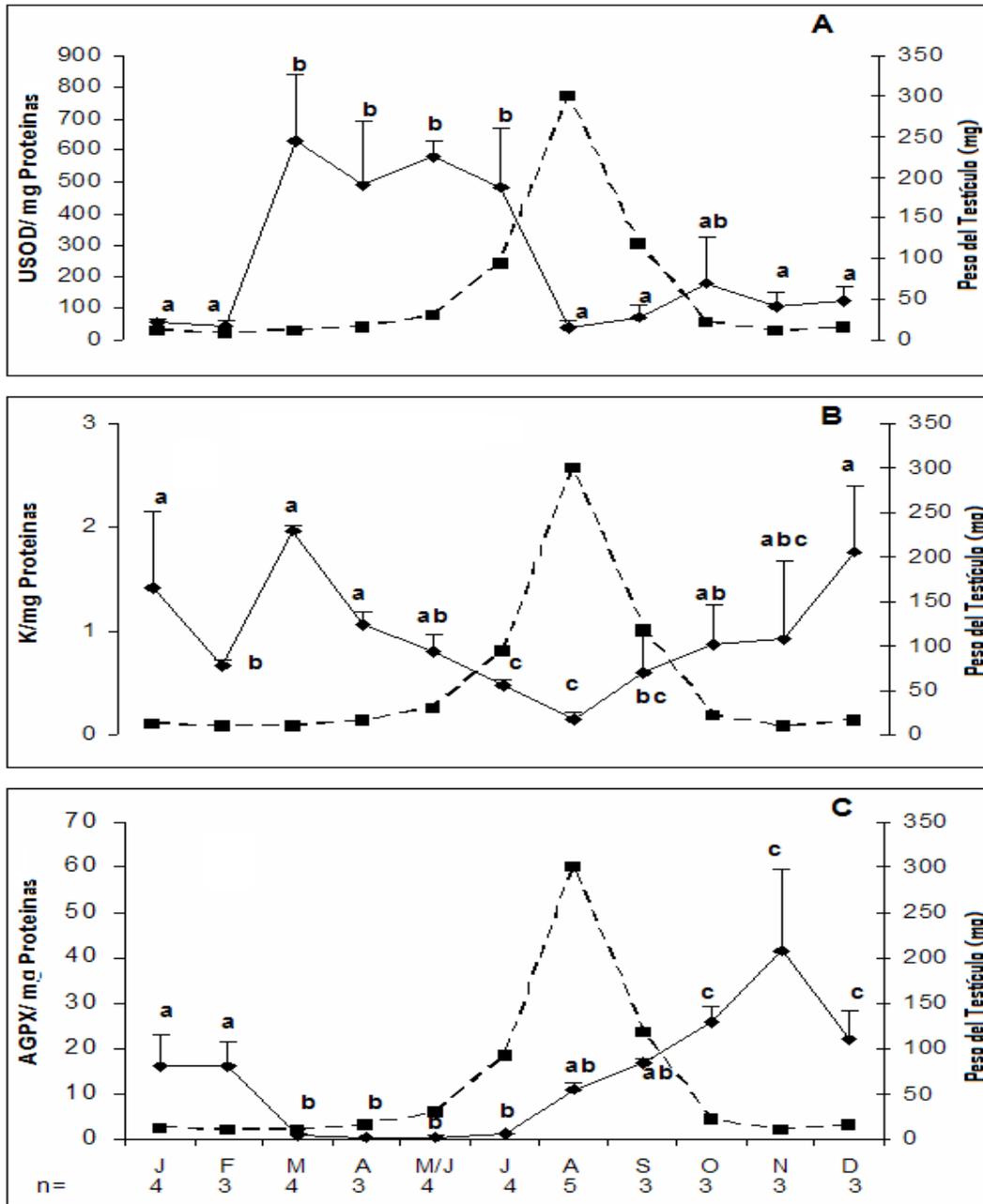


Figura 11 Determinación de actividad específica de las enzimas antioxidantes (línea continua) SOD (A: expresada como USOD [una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de formazán]), CAT (B: expresada como los cambios en K, la tasa constante de la reacción de primer orden) y GPX (C: expresada como AGPX [nmol NADPH oxidado por minuto]) en testículos de murciélagos *C. mexicanus* capturados de enero del 2003 a mayo 2004. Los datos se contrastan con los resultados del peso testicular (línea punteada).

Los puntos representan el promedio \pm ES. Los números en la parte inferior de las gráficas indican el número de murciélagos.

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre valores en el mismo trazo (ANOVA, seguido de Bonferroni).

La producción de espermatozoides es un proceso que debe mantenerse durante todo el periodo reproductivo del organismo, para tal caso, es requerida una masiva proliferación y diferenciación de éstas células que involucra, un buen sistema de regulación y de control de calidad, mismo que puede ser asegurado por la muerte celular programada o apoptosis (Sinha-Hikim y Swerdloff, 1999).

Se ha mostrado que la producción de ERO es alta en los tejidos reproductivos (Agarwal y col. 2003), y la muerte celular programada es eficazmente inducida por estrés oxidativo (Buttke y Sandstrom 1994; Tilly y Tilly 1995; Kumagai y col. 2002). Por tal motivo, y como nuestros datos indican, podemos decir que: la eficiente participación de los mecanismos de defensa antioxidantes, incluyendo la asociación de la actividad de los diferentes tipos de SOD (Peltola y col. 1992; Mruk y col. 1998), CAT y los diferentes tipos de GPX (Roveri y col. 1992; Brigelius-Flohé 1999), son importantes durante el ciclo de recrudescencia-involución de las funciones espermatogénicas y endocrinológicas en mamíferos con un tipo de reproducción estacional.

A su vez, ha sido reportado que el desarrollo testicular observado desde el periodo post natal hasta la pubertad en humanos, es regulado principalmente por una disminución en el número de células testiculares que experimentan apoptosis (Berenstein y col. 2002). De acuerdo a esto nuestros datos muestran, que, durante los meses que inmediatamente preceden y/o acompañan a la recrudescencia testicular en el murciélago *C. mexicanus*, la actividad de las enzimas antioxidantes alcanzan sus valores más altos. De ese modo es posible postular, que: el desarrollo testicular en mamíferos con un tipo de reproducción estacional, puede ser regulada a través de una disminución en la apoptosis testicular.

Por otro lado, inmunoensayos específicos de la distribución de la PHGPX en testículo de rata indican que, la actividad de ésta enzima está limitada a células

espermatogénicas maduras, siendo específicamente localizada tanto en la periferia como en el citoplasma, la membrana nuclear y la mitocondria. Sin embargo, en células de sertoli y células de Leydig no se encuentra (Roveri y col. 1992). Esto es importante de considerar en vista a los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que, de acuerdo con Roveri y colaboradores, la actividad total de GPX durante el ciclo testicular del murciélago *C. mexicanus* parece ser sintetizada en la fase de regresión testicular. De ese modo nosotros podemos concluir, que: durante la involución y quiescencia testicular, la GPX podría participar en la preservación de las células de Sertoli y células de Leydig (Peltola y col., 1996).

Es importante mencionar que los patrones de actividad de las enzimas antioxidantes determinadas en el presente trabajo, son muy similares a los patrones encontrados en las diferentes regiones del epidídimo de la misma especie (Arenas-Ríos y col., 2005), particularmente durante la fase de maduración en el ciclo del epidídimo, ésta similitud puede apuntar a la existencia de un mecanismo de regulación similar en el testículo y en el epidídimo, o aun mas importante, la necesidad de participación del testículo en la síntesis de enzimas antioxidantes para ser usadas posteriormente, dentro del ambiente epididimario.

Jow y colaboradores (1993) mostraron que la Cu/Zn SOD cambia su distribución durante el desarrollo testicular, desde una uniforme distribución en ratas pre puberes, a un patrón específico de expresión, en animales maduros o viejos; ya que en adultos, el RNAm de la Cu/Zn SOD fue principalmente sintetizada en túbulos seminíferos de los estados VI al VIII, sugiriendo que la Cu/Zn SOD fue probablemente requerida durante el proceso de espermiación. Sin embargo, los resultados del presente trabajo no coinciden con lo reportado por Jow y colaboradores, ya que en el murciélago *C. mexicanus* la actividad de

la SOD resultó ser importante antes o en el comienzo del desarrollo testicular, y muy bajo en el momento en que la espermiación es esperada.

Algunos estudios han sugerido que las ERO pueden afectar eventos críticos asociados con la esteroidogénesis (Stocco y col. 1993; Diemer y col. 2003; Luo y col. 2006), encontrando también, una disminución de las enzimas antioxidantes en células de Leydig y células adrenocorticales relacionada con la edad (Zirkin y Chen 2000; Chen y col. 2001; Luo y col. 2006), demostrando que: las ERO pueden estar involucradas en la función esteroidogénica de las células de Leydig. Resultando sumamente importante lo mencionado por Kumar y colaboradores (1990), ya que sugieren que, la SOD podría estar actuando como un interruptor en la esteroidogénesis testicular.

De tal modo, la función de las células de Leydig y la síntesis de testosterona en la reproducción estacional de la familia vesperilionidos, parecen estar coordinadas con el incremento en el tamaño testicular y con la espermatogénesis. Siendo, el nivel de las enzimas antioxidantes que precede y acompaña el desarrollo testicular, muy importante en el murciélago *C. mexicanus*, especialmente la CAT, ya que, podría estar relacionada con la protección en contra de las ERO, producto de la viabilidad y el funcionamiento de las células de Leydig.

Las células de Sertoli son esenciales para el desarrollo y sostén de la función testicular (McLaren 2000), y se ha mostrado que la capacidad del testículo adulto para generar un número adecuado de espermátides, depende del número de células de Sertoli producto del desarrollo testicular (Orth y col. 1988). Por consiguiente, mantener el número de células de Sertoli y la actividad durante la involución testicular y la quiescencia en individuos jóvenes con el tipo de reproducción estacional, puede ser crucial para la regresión normal en la fertilidad adulta, pues al parecer las células de Sertoli, son

resistentes a los efectos del estrés oxidativo disminuyendo el uso de la cadena respiratoria mitocondrial y procesando la glucosa anaerobicamente (Robinson y Fritz 1981; Erkkila y col. 2003; Brauchi y col. 2005).

5.6.2. ESPERMATOZOIDES Y FLUIDO EPIDIDIMARIO

En la figura 12 se muestra la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPX en espermatozoides (figura 12A); y CAT, SOD y GPX en fluido (figura 12B) de la región cefálica del epidídimo, del murciélago *C. mexicanus*; en la figura 13 (figura 13A: espermatozoides; figura 13B: fluido) de la región caudal.

Aun cuando se observó a finales de agosto la presencia de espermatozoides, la cantidad de estas células no fue suficiente para determinar la actividad de las diferentes enzimas.

La actividad de SOD no fue detectada en espermatozoides obtenidos de ninguna de las dos regiones del epidídimo. En el caso particular de CAT y aun cuando no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA; cabeza: $F=0.979$, $P<0.05$; cola: $F=1.168$, $P<0.05$), se observa que en los espermatozoides obtenidos de la región cefálica, la actividad más alta es obtenida a principios de septiembre y la más baja a finales del mismo mes, aumentando ligeramente hasta finales de octubre. No así en los espermatozoides obtenidos de la región caudal, donde la actividad de CAT alcanza los valores más altos a finales de septiembre, bajando abruptamente a mediados de octubre sin recuperar su actividad en la siguiente fecha. De los resultados de actividad de GPX en espermatozoides de cabeza y cola del epidídimo, se obtiene un patrón similar en ambas regiones, pues los valores más altos encontrados se observan a mediados de septiembre,

disminuyendo significativamente a finales de éste mes, y permaneciendo bajos hasta la última fecha de captura.

En el fluido epididimario, la actividad de CAT presenta un patrón similar en la región cefálica, que lo encontrado para SOD y GPX en ambas regiones, pues aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en CAT y GPX a diferencia de lo encontrado para SOD (ANOVA; CAT: $F=0.509$, $P<0.05$; GPX-Cabeza: $F=3.151$, $P<0.05$; GPX-Cola: $F=0.251$, $P<0.05$), se observan valores elevados en septiembre, presentando una pronunciada disminución a mediados del mes de octubre y aumentando nuevamente a finales de octubre en la actividad de CAT y GPX, pues la actividad de SOD permanece baja hasta finales de octubre. El patrón de actividad de CAT en la región caudal, se presenta muy baja a mediados de septiembre, y aumenta gradualmente hasta llegar a sus valores más altos a finales de octubre, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (ANOVA; cola: $F=0.329$, $P<0.05$).

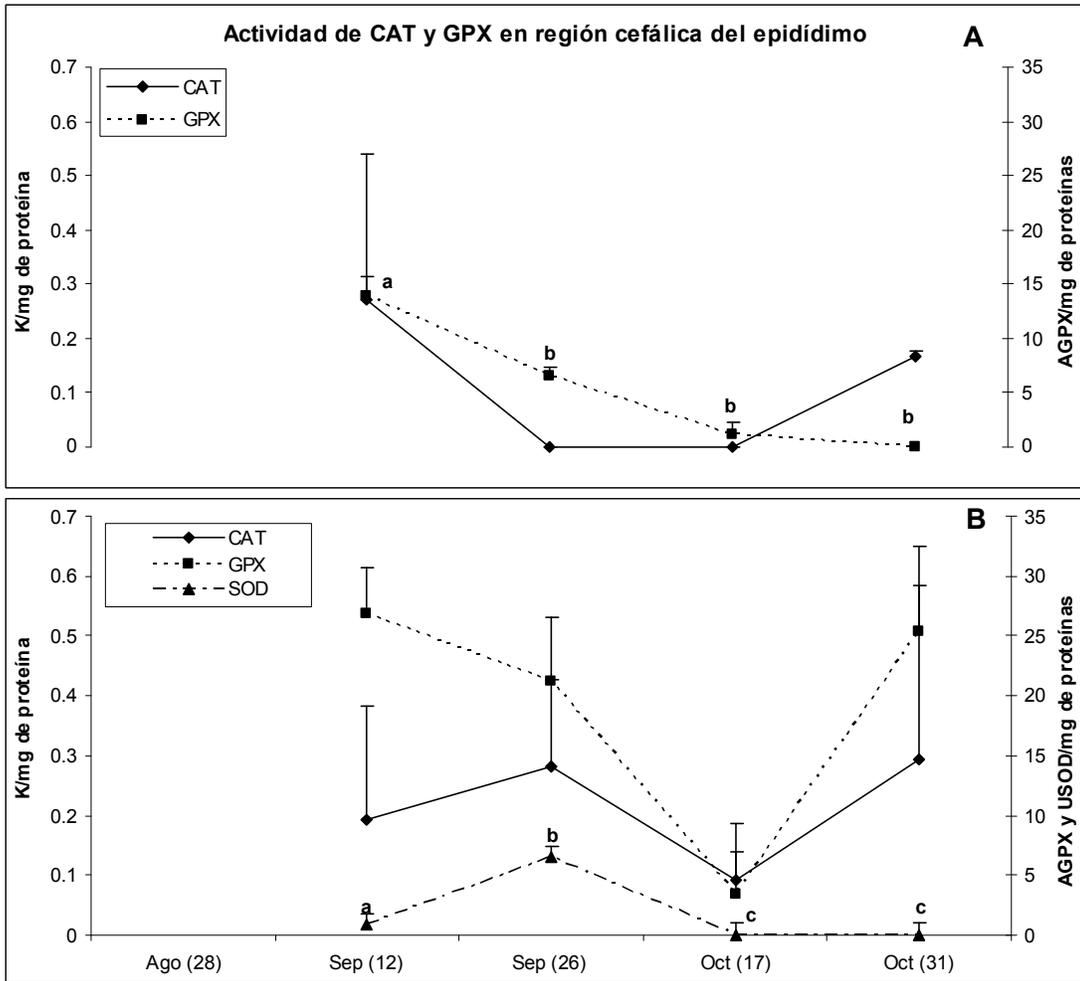


Figura 12 Determinación de actividad de las enzimas antioxidantes CAT (línea continua), SOD (línea discontinua) y GPX (línea punteada) en espermatozoides y fluido de la región cefálica del epidídimo del murciélago *C. mexicanus*, capturados de finales de agosto a finales de octubre (2006-2007).

A. Espermatozoides

En el caso de GPX: Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, seguido de prueba de Tukey).

En el caso de CAT: No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F=0.979$, $P<0.05$)

B. Fluido epididimario

En el caso de SOD: Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, seguido de prueba de Tukey).

En ninguno de los otros casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas (CAT: $F=0.329$, $P<0.05$; GPX: $F=3.151$, $P<0.05$).

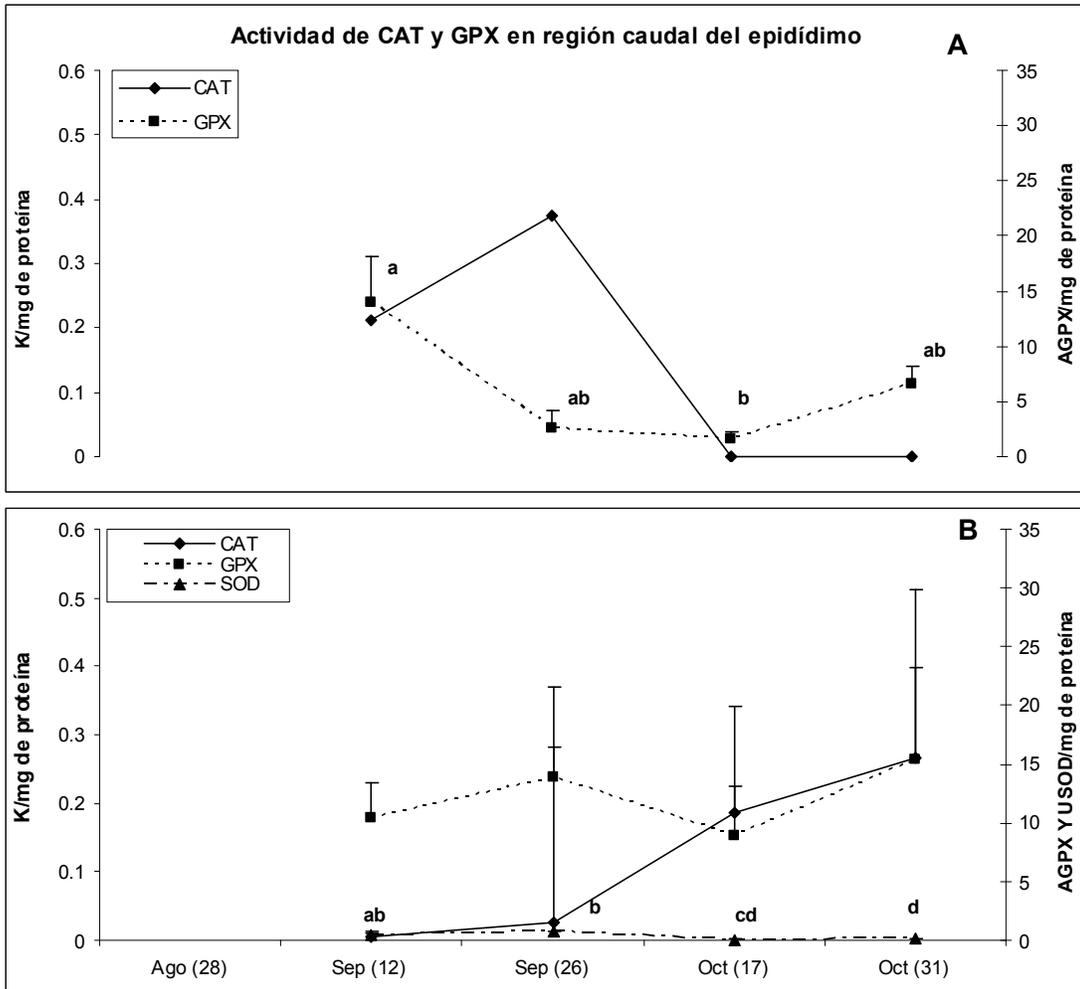


Figura 13 Determinación de actividad de las enzimas antioxidantes CAT (línea continua), SOD (línea discontinua) y GPX (línea punteada) en espermatozoides y fluido de la región caudal del epidídimo del murciélago *C. mexicanus*, capturados de finales de agosto a finales de octubre (2006-2007).

A. Espermatozoides

En el caso de GPX: Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, seguido de prueba de Tukey).

En el caso de CAT: No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F=1.168$, $P<0.05$)

B. Fluido epididimario

En el caso de SOD: Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en el mismo trazo (ANOVA, seguido de prueba de Tukey).

En ninguno de los otros casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas (CAT: $F=0.509$, $P<0.05$; GPX: $F=0.251$, $P<0.05$).

El transporte de los espermatozoides a través del epidídimo no es una función pasiva, ya que durante su paso los espermatozoides interactúan activamente con el ambiente epididimario, con el propósito de lograr la maduración espermatocítica, proceso que marca la capacidad total de llevar a cabo los procesos necesarios, que acompañan a la fertilización: movilidad progresiva, capacitación, hiperactivación y reacción acrosomal. Posteriormente los espermatozoides deben permanecer en condiciones viables y fértiles durante un periodo de almacenamiento, tiempo que va de pocos días a varias semanas dependiendo de la especie, hasta la eyaculación. En la mayoría de los mamíferos la función epididimaria depende de la función testicular, sin embargo, en murciélagos vespertilionidos y rinolofidos, se presenta una notable asincronía entre las funciones testiculares y epididimarias.

Se ha observado en varias especies de mamíferos, usando el sistema de la región caudal del epidídimo, en los cuales ambos extremos han sido ligados (Lubicz-Nawrocki 1974), que los espermatozoides almacenados en la región caudal de animales intactos no orquiectomizados, degeneran después de varias semanas, pero no disminuyen notablemente en número (Jones 2004). Si la orquiectomía lateral es practicada al mismo tiempo que la región caudal del epidídimo es aislada, los espermatozoides mueren rápidamente y prácticamente desaparecen en pocos días (>90%). Este efecto de la castración bilateral puede ser prevenido por la administración de testosterona (Jones 2004). Como los niveles de testosterona disminuyen en animales que presentan una reproducción estacional, el número de espermatozoides en el epidídimo disminuye y finalmente desaparece (Millar 1972).

Observaciones realizadas en el murciélago *C. mexicanus* indican, que los testículos involucionan totalmente al tiempo que los espermatozoides son almacenados, quedando el

epidídimo particularmente funcional (Arenas-Ríos y col., 2005; León-Galván y col., 2005; Arenas-Ríos y col., 2007), por lo que se propone que el epidídimo en esta especie, y en los murciélagos de las familias vespertilionidos y rinolofidos, los cuales muestran la misma asincronía temporal en el desarrollo y función de los órganos reproductores masculinos (Krutzsch 2000; León-Galvan y col. 2005), tienen un particular ciclo funcional: una fase testicular inicial, probablemente dependiente de las funciones testiculares, y una segunda fase posttesticular, en la cual las funciones del epidídimo es independiente de la función testicular (Arenas-Ríos y col., 2005). De acuerdo con esto, debemos mencionar que el patron de las enzimas antioxidantes observadas para el *C. mexicanus*, de finales de agosto a finales de octubre, es significativamente diferente a lo propuesto por Gu y Hecht (1996), los cuales sugieren que hay un solo patrón de actividad para gametos masculinos en mamíferos, y que nuestros datos corresponden a lo reportado por Arenas-Ríos y colaboradores (2005). De hecho, Arenas-Ríos y colaboradores encuentran dos patrones muy distintos de actividad dependiendo de la fase del ciclo reproductivo del murciélago *C. mexicanus*. La actividad de CAT está claramente presente en ambos segmentos del epidídimo durante todo el ciclo reproductivo, pero se observa particularmente alta durante la fase posttesticular de la función epididimaria. La actividad de la SOD está presente durante la fase testicular, durante el transporte y la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, pero se encuentra casi completamente ausente o inhibida en ambas regiones durante la fase posttesticular, es decir, durante el periodo de almacenamiento espermático. Por otro lado, la actividad de GPX es baja durante la fase testicular correspondiente a la fase de maduración de los espermatozoides en el epidídimo y alta en ambas regiones del epidídimo durante la fase de almacenamiento espermático.

Debido a que en el presente trabajo se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes en espermatozoides aislados de la región cefálica y región caudal del epidídimo, contrastándolo con la actividad encontrada en el fluido epididimario, las determinaciones se limitaron a la etapa posttesticular, ya que los espermatozoides fueron encontrados en el epidídimo, hasta finales de agosto, etapa que coincide con el inicio de la regresión testicular (León-Galván y col., 2005; Arenas-Ríos y col., 2005; Arenas-Ríos y col., 2007), encontrando, que el patrón de actividad de las enzimas antioxidantes en espermatozoides, resultó similar a lo encontrado por Arenas-Ríos y colaboradores (2005), en el órgano (en ambas regiones del epidídimo), pues el patrón de actividad de CAT presenta una tendencia a disminuir de septiembre a octubre, al igual que la GPX, y del mismo modo que lo reportado en órgano, la SOD en estas fechas reporta sus valores ínfimos, que tienden a cero, coincidiendo con la actividad en espermatozoides, ya que, no fue detectada la actividad de ésta enzima.

En el caso de la actividad enzimática producto del fluido epididimario, encontramos en el fluido de la región cefálica un patrón similar en CAT y GPX, que lo obtenido en el fluido de la región caudal. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado para espermatozoides, la actividad de CAT tiene una tendencia a aumentar de septiembre a octubre en el fluido de la región caudal. Por lo que se puede deducir, que, la actividad observada en el órgano completo (Arenas-Ríos y col., 2005) está dada principalmente por el fluido epididimario. La actividad de GPX producto del fluido de la región cefálica, presenta un patrón similar a lo reportado para el órgano completo, excepto a finales de octubre, mes en el que se observa un aumento a diferencia de lo encontrado para el órgano (aunque sin diferencias estadísticamente significativas), y por último, en el caso de la SOD determinada en el fluido epididimario, aun cuando sus valores de actividad resultaron muy

bajos con respecto a lo reportado para órgano (1:10 en cabeza; 1:100 en cola), se observa un aumento significativo a finales de septiembre.

De los trabajos donde se ha determinado la actividad de las enzimas antioxidantes en espermatozoides, la mayoría de los autores usan espermatozoides de eyaculado para su determinación. En general, los resultados encontrados en el presente trabajo, son similares a lo publicado para espermatozoides de rata (Tramer y col., 1998), y con lo publicado para GPX en bovino, y muy bajo con respecto a lo publicado para SOD. A diferencia de lo reportado, en éste trabajo si detectamos una actividad, aunque baja, de CAT en espermatozoides (Bilodeau y col., 2000).

Cada vez aumentan más las evidencias sobre la regulación de los caminos redox, a través de la generación de ERO y la actividad de las enzimas antioxidantes en ambientes intra y extracelulares de los espermatozoides, debiendo ser considerado un aspecto central de la maduración en el epidídimo (Aitken y Vernet 1998), ya que, se ha mostrado que una serie importante de eventos estructurales y fisiológicos de la maduración en espermatozoides, son susceptibles a la acción de las ERO, incluyendo la integridad del ADN (Aitken y col. 1998b; Aitken y Krausz 2001), capacidad para sufrir capacitación y reacción acrosomal (de Lamirande y col. 1997; Ecroyd y col. 2003; Ford 2004; Rivlin y col. 2004), y la interrupción de la capacidad para fusionarse con el ovocito (Aitken y col. 1998b). Sin embargo, se ha reportado que la presencia controlada de ERO en el ambiente epididimario, es requerido para la maduración de los espermatozoides. El incremento de las evidencias, sugieren, que las bajas y controladas concentraciones de ERO, participan en los mecanismos de transducción (Bauskin y col. 1991; Fialkow y col. 1993), siendo seguramente, de lo más importante para nuestro entendimiento, de los procesos que participan en la maduración y almacenamiento espermático.

Nuestros datos confirman la importancia de la regulación de la producción de ERO mediante la actividad de las enzimas antioxidantes, ya sea, que estén presentes en el ambiente intra, y/o extra celular del espermatozoide (Cuadro 2), para que de ese modo la producción de ERO se mantenga a niveles adecuados, para su participación en los procesos epididimarios y/o se eviten daños a nivel celular (figura 10B).

Correlaciones obtenidas de las diferentes determinaciones				
	Cabeza de epidídimo		Cola de epidídimo	
	Espermatozoides	Fluido	Espermatozoides	Fluido
ERO Vs CAT	-0.5084	-0.5094	-0.5592	0.8537
ERO Vs GPX	-0.8975	-0.8046	-0.7840	0.3490
ERO Vs SOD		-0.5162		-0.6200

Cuadro 2 Correlaciones obtenidas del patrón de actividad de las enzimas antioxidantes y la producción de ERO.

Al menos dos cascadas de transducción se han propuesto que son reguladas por ERO en los espermatozoides: una regulación redox mediada por AMPc mediante la fosforilación de tirosina (Aitken y col. 1998b), y las señales extracelulares reguladas por la cascada de las cinasas (de Lamirande y Gagnon 2002). Sin embargo, el conocimiento que se tiene al respecto en los procesos de maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides, en especies que presentan un patrón reproductivo similar al *C. mexicanus*, es casi inexistente. Es posible que los aspectos iniciales de éste proceso, puedan ser similares a lo observado para otras especies de mamíferos, y de los que parecen estar bajo el control redox se encuentran: la condensación nuclear, la estabilización

mitocondrial, la capacidad de los espermatozoides de moverse progresivamente, la preparación para la hiperactivación y la fusión del espermatozoide con el ovocito (de Lamirande y col. 1997; Leclerc y col. 1997; Lewis y Aitken 2001; Ford 2004). Es importante considerar, que en el *C. mexicanus*, las enzimas CAT, SOD y GPX, están presentes en el epidídimo, en las regiones cefálica y caudal, durante la fase testicular o de maduración espermática, pero en esta etapa la actividad de SOD se encuentra ausente o inhibida en las regiones cefálica y caudal del epidídimo (Arenas-Ríos y col., 2005), y en espermatozoides. Sin embargo, es posible que el pico de actividad de ésta enzima a finales de septiembre, podría estar participando en la maduración de los espermatozoides que se realiza en ésta última etapa, ya sea en la región cefálica o incluso en la región caudal (Cervantes y col., 2008).

La presencia de ERO en el sistema espermático durante la maduración, es requerida para la fosforilación de las proteínas del axonema (de Lamirande y Gagnon 1992a, 1992b), pues de otro modo, podría resultar en anomalías en la movilidad espermática, disminuyendo la capacidad de los espermatozoides de adquirir la hiperactivación, evitando así, una exitosa fertilización (Griveau y col. 1995).

El O_2^- al ser generado no es particularmente tóxico, ya que tiene un tiempo de vida muy corto (1 ms) y porque éste dismuta espontánea o enzimáticamente (por la actividad de SOD) a H_2O_2 , molécula que al contrario que O_2^- tiene un potencial altamente oxidante, y relativamente estable, pues al no tener carga es libremente difundible, motivo por el cual, es considerada como la ERO más oxidante para los espermatozoides (de Lamirande y col. 1997). Los resultados del presente trabajo muestran, que, la presencia de las diferentes enzimas antioxidantes en fluido epididimario, están en armonía con estos requerimientos, particularmente si nosotros notamos que, durante la fase posttesticular, en la región cefálica

del epidídimo, altos niveles de actividad de SOD, corresponde generalmente con altos niveles de actividad de GPX; así como en la región caudal del epidídimo, altos niveles de actividad de SOD, corresponde generalmente con altos niveles en la actividad de CAT y GPX. Además de esto, la generación de cantidades adecuadas de H_2O_2 , a través de la actividad de SOD, es también necesaria durante la maduración epididimaria, provocando la estabilización de la capsula mitocondrial mediante la oxidación de tioles (Godeas y col. 1997; Pfeifer y col. 2001; Roveri y col. 2001). Ha sido mostrado que el glutatión reducido (GSH) es un importante regulador del estado redox intracelular (Barres y col. 1992; Watson 2002). Por consiguiente, el sistema conjugado de enzimas GPX/GRD, es muy importante en la regulación del equilibrio entre la forma oxidada y reducida del GSH, durante la maduración epididimaria y particularmente en murciélagos vespertilionidos y rhinolofidos, durante el largo periodo de almacenamiento espermático en la cola del epidídimo, región donde se ha reportado, recientemente, termina el proceso de maduración espermática (Cervantes y col., 2008).

El equilibrio redox con los cuales los espermatozoides tienen contacto, al progresar del testículo al epidídimo, debe ser específica y diferencialmente controlado para asegurar la realización adecuada de las funciones que son importantes para el éxito reproductivo. Los datos surgidos de este trabajo, demuestran que, existe la necesidad de un buen funcionamiento de regulación, entre la producción de ERO y la actividad de las enzimas antioxidantes, en testículo y epidídimo del murciélago *C. mexicanus* durante su ciclo reproductivo, cuyo buen funcionamiento depende de esta regulación.

6. CONCLUSIÓN

El murciélago *C. mexicanus*, exhibe un único ciclo reproductivo al año, con una asincronía temporal entre el desarrollo testicular y el epididimario. Los espermatozoides comienzan a estar presentes en el epidídimo, a partir de, finales de agosto, y permanecen en éste órgano hasta, finales de octubre (última fecha de captura). Encontrando en cabeza y cuerpo siempre concentraciones bajas [0.71-30 millones] de espermatozoides, y altas en la región caudal [3.21-318 millones], mismas que aumentan progresivamente de agosto a octubre.

La producción de ERO entre espermatozoides de cerdo y espermatozoides epididimarios del murciélago *C. mexicanus* (región cefálica y caudal), no es diferente; y ésta producción no es estimulada con NADPH. Tampoco varía la producción de ERO, entre las diferentes fechas en que los espermatozoides son obtenidos, de cabeza y cola del epidídimo de murciélagos *C. mexicanus*.

La lipoperoxidación de los espermatozoides del murciélago *C. mexicanus*, no es inhibida al agregarle fluido epididimario del murciélago *C. mexicanus*, y la lipoperoxidación de los espermatozoides de cerdo, es estimulada al agregarle fluido epididimario del murciélago *C. mexicanus*. Esta estimulación, es mayor al agregarle fluido de la región cefálica del epidídimo capturado a mediados de septiembre; al agregarle fluido de la región del cuerpo del epidídimo capturado a finales de agosto, y al agregarle fluido de la región caudal del epidídimo capturado a finales de octubre.

El aumento de la actividad de SOD, y la disminución de la actividad de GPX, son muy importantes en etapa de recrudescencia testicular, así como la disminución de la

actividad de SOD y CAT, en etapa de máximo desarrollo testicular. En la etapa de regresión testicular se requiere un aumento de la actividad de CAT y GPX.

En la etapa posttesticular, los espermatozoides epididimarios, obtenidos de ambas regiones, requieren que, la actividad de SOD se encuentre ausente o inhibida, la actividad de CAT se mantenga constante y la actividad de GPX aumente en el mes de septiembre.

Para el fluido epididimario, en la etapa posttesticular, es importante la actividad de las tres enzimas: que la actividad de CAT y GPX no presenten cambios, y un aumento de la actividad de la SOD en septiembre.

7. APÉNDICE I. *Reactivos*

Obtenidos de laboratorios Sigma

- Ácido tiobarbitúrico
 - Ácido tricloroacético
 - Albúmina sérica bovina
 - 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
 - EDTA
 - Eosina
 - Fluoruo sulfonyl fénilo
 - Folín
 - HEPES
 - MgCl₂
 - NADPH
 - NaHPO₄
 - NaN₃
 - Nigrosina
 - Sulfato cúprico
 - Tetrametoxipropano
 - Tritón X-100
-
-

Obtenidos de laboratorios Backer

- Dextrosa
 - Etanol
 - H_2SO_4
 - KCl
 - KH_2PO_4
 - KMnO_4
 - MgSO_4
 - NaCl
 - Na_2CO_3
 - NaHCO_3
 - NaOH
-

Obtenidos de laboratorios Merck

- H_2O_2
 - Tartrato de Na/K
-

Obtenidos de laboratorios Boehringer

- Glutación reducido
 - Glutación reductasa
-

Obtenido de laboratorios Mallinckrodt

-
- CaCl_2
-

Obtenidos de laboratorios Roche Applied Science

-
- Leupeptina
 - Pepstatina
-

Obtenido de laboratorios Randox

-
- Kit de superóxido dismutasa
-

Obtenido de laboratorios Microlab

-
- PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}
-

8. APÉNDICE II. *Soluciones*

Solución de homogenización de tejidos

-
- HEPES 0.1 M

Ajustado a pH 7.4, en agua desionizada

Medio Ringer para el lavado de espermatozoides

-
- NaCl 95 mM
 - KCl 5 mM
 - CaCl₂ 1.7 mM
 - KH₂PO₄ 1.1 mM

Ajustado a pH 7.2, en agua desionizada.

Medio estimulante del oviducto (OSM) modificado para extracción e incubación de los espermatozoides

-
- NaCl 108 mM
 - KCl 10 mM
 - MgCl₂ 0.5 mM
 - Hepes 40 mM
 - NaHPO₄ 0.5 mM
 - Glucosa 1.5 mM

- EDTA 0.4 mM

Ajustado a pH 7.2, en agua desionizada.

Solución de para viabilidad espermática

- Eosina 1% en agua destilada
- Nigrosina 10% en agua destilada

En proporción 2:3 (Volumen/Volumen) respectivamente.

Soluciones para la determinación de ERO

- Solución OSM (previamente descrita)
- DCF 32 μ M
- H₂O₂ 10 mM (en agua desionizada)
- NADPH 1.5 mM (en NaHCO₃ al 0.2%)

Mantenidas en frío y oscuridad.

Soluciones para determinación de lipoperoxidación

- Solución de ácido tricloroacético al 35%
- Ácido tiobarbitúrico al 75%

Para realizar la curva de calibración:

- Stock de tetrametoxipropano 1.7 µl/ml

En agua desionizada.

Medio de lisis para espermatozoides

- KH_2PO_4 0.1 M
 - EDTA 1 Mm
 - Leupeptina 1.0 µg/ml
 - Pepstatina 1.4 µg/ml
 - Fluoruo sulfonil fenilo 70 µg/ml
 - Triton X-100 al 0.5%.
-

Soluciones para determinación de proteínas

- Solución estándar preparado de albúmina sérica bovina (fracción V) en:
 - NaCl 0.9%
- Mezcla cuproalcalina
 - 5 g de Na_2CO_3
 - 0.05 g de tartrato doble de Na y K
 - 1 g de NaOH
 - 0.25 g de sulfato cúprico

En agua destilada previamente hervida para eliminar el CO_2

- Reactivo de Folín

En agua desionizada.

Soluciones para la determinación de actividad enzimática

- **SOD**

- 80 U/l de xantina oxidasa
 - Solución del substrato mixto
 - Xantina 0.05 Mm
 - I.N.T (cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio)
0.025 mM
- Preparado en una solución amortiguadora de CAPS 40 mM ajustada a pH 10.2 y EDTA 0.94 mM.

- **CAT**

- Etanol al 96%
- Tritón X-100 al 10%
- H₂O₂ 6mM (mantenido en frío y en oscuridad)
- H₂SO₄ 6N
- KMnO₄ 0.1N

Para este sistema de reacción la solución amortiguadora fue Hepes 0.1M ajustada a pH 7.4.

- **GPX**

- Mezcla de reacción
 - Glutati3n reductasa a 120 u/ml
 - Glutati3n reducido 1.4Mm

- NaN_3 0.15M

En solución amortiguadora (HEPES 0.1 M con EDTA 1 mM ajustada a pH 7.4)

- NADPH 1.5 Mm
 - H_2O_2 1.5 mM (mantenida en frío y en oscuridad)
-

Apéndice III. *Difusión de los resultados*

Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction or distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 148 (2007) 150–158

CBP

www.elsevier.com/locate/cbpa

Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle

E. Arenas-Ríos^{a,*}, M.A. León-Galván^c, P.E. Mercado^b, R. López-Wilchis^c,
D.L.M.I. Cervantes^b, A. Rosado^b

^a Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340. México D.F., México

^b Laboratorio de Reproducción Animal Asistida, Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340. México D.F., México

^c Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos, Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina 09340. México D.F., México

Received 1 February 2007; received in revised form 29 March 2007; accepted 1 April 2007

Available online 6 April 2007

Abstract

The reproductive physiology of *Corynorhinus mexicanus* includes a testes growth–involution cycle. Testis recrudescence begins in May–June, peaks in August and then undergoes a profound involution being totally regressed in November. Adult, male individuals were captured monthly during one year and ROS scavenging enzyme activities were measured in testes and expressed per total wet-weight and per mg protein. SOD total activity is very low from October to February; increases sharply one full month before testes recrudescence starts, and in August, when testis activity was at its peak, SOD is 3–4 times lower than in July. Catalase total activity is bimodal. The main peak of activity occurs during testicular recrudescence with an additional smaller peak, two months before the onset of recrudescence. Glutathione peroxidase total activity parallels almost exactly the testis growth cycle, increases in July, reaches a peak in August and decreases through September to almost disappear in October. SOD specific activity shows a pre-testicular increase of activity, maintains its activity from March to July and then descends drastically to almost nil in August, maintaining these low values until February. Catalase specific activity is particularly important during the period of testicular regression. GPX specific activity is low from March to July, months of testicular recrudescence; whereas its activity increases in August and peaks in November, when testes regression occurs. Our data show that ROS-scavenging enzymes may play a very important role during testes involution–recrudescence in *C. mexicanus*, and we believe their participation could be equally important in all seasonally breeding mammals. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Antioxidant enzymes; Bat reproduction; Oxidative stress; ROS generation; ROS scavenging; Spermatogenesis; Testes growth; Testes recrudescence

1. Introduction

Males of monoestrous vespertilionid and rhinolophid bats frequently show an important temporal asynchrony in the development and function of reproductive organs (Kruttsch, 2000; León-Galván et al., 2005). These bat species present a testicular annual cycle that goes from recrudescence to full activity and then to an involution stage that extends for several months until the testes seem to be totally regressed. Occurrence of this annual testicular reproductive cycle, as well as epididymal sperm storage in *Corynorhinus mexicanus* (López-Wilchis, 1989; León-Galván et al., 1999, 2005; Arenas-Ríos et al., 2005), a vespertilionid

* Corresponding author. Laboratorio de Reproducción Animal Asistida, Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340. México D.F., México. Tel.: +52 55 5804 47 06; fax: +52 55 5804 49 30.

E-mail addresses: editharenas2000@yahoo.com.mx (E. Arenas-Ríos), leon@xanum.uam.mx (M.A. León-Galván), mepe@xanum.uam.mx (P.E. Mercado), rlw@xanum.uam.mx (R. López-Wilchis), isacerv@yahoo.com.mx (D.L.M.I. Cervantes), graado@cablevision.net.mx (A. Rosado).

endemic to México, makes this bat a very interesting model to study the biochemical and endocrinological processes which participate in the recrudescence and regression cycle of reproductive tissues (León-Galván et al., 2005; Arenas-Ríos et al., 2005).

Apoptotic cell death is a frequent and important process during normal spermatogenesis (Blanco-Rodríguez and Martínez-García, 1996; Ikeda et al., 1999) and during experimentally induced testicular regression (Nonclercq et al., 1996; Nair and Shaha, 2003). Apoptosis also plays a central role in the testicular regression that occurs naturally in seasonally breeding mammals (Furuta et al., 1994; Štrbenc et al., 2003). Apoptosis of testicular cells is stimulated by various stress conditions, including exposure of testis to toxic compounds (Cai et al., 1997; Krishnamoorthy et al., 2005), heat exposure (Ikeda et al., 1999; Miura et al., 2002), and, particularly, by oxidative stress (Buttke and Sandstrom, 1994; Tilly and Tilly, 1995; Kumagai et al., 2002).

In spite of this well known susceptibility of both the germinal and the somatic cells of testis to oxygen stress, the presence and cellular distribution of antioxidant scavenging systems, particularly enzyme activities, in this organ has not been extensively studied, particularly in relation to the testicular growth–regression cycle present in seasonally breeding mammals. It has been clearly demonstrated, particularly in the rat and in the human, that germ cells express important activities of cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) and of Mn SOD (Bauché et al., 1994; Fujii et al., 2003). High levels of phospholipid's hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) have been found in testes (Roveri et al., 1992; Fujii et al., 2003), being preferentially expressed in the round spermatid layer (Maiorino et al., 1998). On the other hand, it has been shown that Leydig, peritubular myoid, and Sertoli cells have significant levels of SODs (Bauché et al., 1994; Luo et al., 2006), catalase (Kukucka and Misra, 1993) and of glutathione peroxidases (Bauché et al., 1994; Luo et al., 2006).

The characteristic behavior of the scavenging enzymes during the seasonal reproductive cycle may be related, not only to its antioxidant protective function preventing apoptosis (Nomura

et al., 1999; Brielmeier et al., 2001), but also to the proposed role of these enzymes as important regulators of the cellular peroxide tone and, through this mechanism, as regulators of general cell metabolism (Irani et al., 1997; Finkel, 1998). In fact, cellular peroxide tone, regulated at least in part by the equilibrium ROS generation/ROS scavenging, has been implicated in cell growth (Wang et al., 2003) and differentiation (Yang et al., 2002; Chang, 2003; Li et al., 2000; Wang et al., 2003).

Testicular γ -glutamyl transpeptidase (GGT), a membrane-bound enzyme involved in amino acid transport across the plasma membrane, has been considered as a useful marker of Sertoli cell function (Hodgen and Sherins, 1973; Lu and Steinberger, 1977; Carreau et al., 1996; Ojha et al., 2006). This enzyme is essential to the metabolism of the antioxidant glutathione and, as such, is believed to be fundamental to the protection of cells against oxidative stress through the regulation of glutathione levels (Forman and Skelton, 1990; Hanigan and Ricketts, 1993; Markey et al., 1998).

Recrudescence and retrogression of testes are energy demanding processes. Both tissue growth and differentiation, and tissue regression (this last fundamentally by apoptosis) are ATP dependent (Young and Nelson, 2001). Seasonally reproducing males must synchronize their energetically demanding testicular functions in a way that enables individuals to cope with recurring seasonal stressors. When environmental conditions are not favorable, protein synthesis (a highly ATP demanding process) must be restricted to the production of those proteins that are required to carry out essential testicular functions. Determination of the specific activity of scavenger enzymes in the testis of *C. mexicanus* during the reproductive cycle will help to indicate when, and which of the scavenger enzymes must be preferentially synthesized.

The aim of this work was to study the total and the specific activity of the three antioxidant enzymes (catalase, GPX and SOD) that have been proposed as fundamental in the protection of testis activity, particularly during spermatogenesis and during the establishment of the steroidogenic activity of the male gonad, in samples obtained monthly throughout the annual reproductive cycle of *C. mexicanus*. GGT was included not only

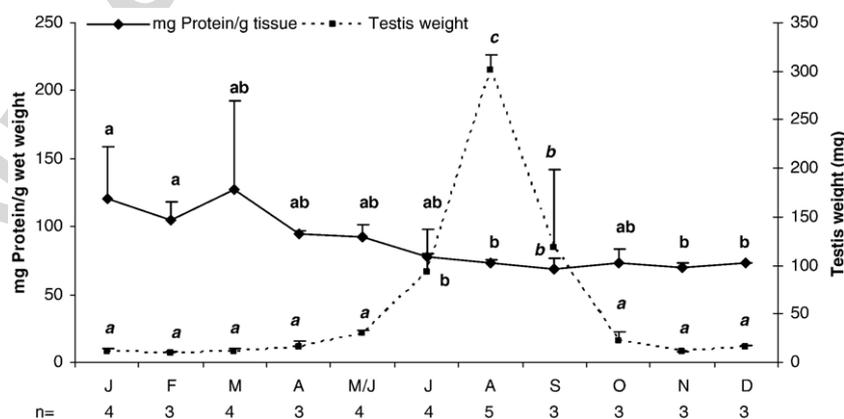


Fig. 1. Pattern of changes of testicular weight and protein testicular concentration in the adult male *C. mexicanus* during its annual reproductive cycle. Data indicate Mean \pm SEM. Numbers in parenthesis indicate the number of bats. Different letters indicate the existence of statistical significant differences between values in the same trace (ANOVA plus Bonferroni post hoc test).

by its participation as a regulator of antioxidant activity, but also as a marker of Sertoli cells functions.

2. Material and methods

Adult, male *C. mexicanus* were captured monthly (León-Galván et al., 2005) from June 2003 to May 2004 in Central México (19°37' N, 98°02' W). Bats were always captured before or as they left their roost. Individuals were sexed, weighed using an Ohaus® portable electronic balance (± 0.01 g), and their forearm length measured with a Vernier caliper (± 0.1 mm). To ensure adult status of bats only those animals with complete ossification of the cartilaginous epiphyseal growth plates of the fourth metacarpal–phalangeal joint were selected (Kunz and Anthony, 1982). After decapitation of the specimens, testes were isolated, cleared of the albuginea, weighed in a Mettler model AB204 balance (± 0.01 mg) and frozen in liquid nitrogen (-170 °C) until utilized. Testes were thawed to 4 °C in ten volumes of cold HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) and homogenized in a Potter–Elvehjem type, glass–glass homogenizer. The obtained homogenates were centrifuged for 10 min at 5000 $\times g$, the precipitates were discarded and all enzymatic activities were measured in the supernatants.

Assay of glutathione peroxidase (GPX; EC.1.11.1.6), superoxide dismutase (SOD; EC.1.15.1.1) and catalase (EC.1.11.1.6) activities were performed as previously described (Arenas-Ríos et al., 2005). Enzymes activities were expressed as USODs in the case of superoxide dismutase (one unit of activity is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of the formazan dye formation by 50%) (Bogdanska et al., 2003); as changes in k (the constant rate of the first order reaction) (Cohen et al., 1970), in the case of catalase; and in the case of glutathione peroxidase as AGPX (nmoles NADPH oxidized per minute).

γ -Glutamyl transpeptidase (GGT; EC 2.3.2.21) activity was determined by the method of Yash and Tapani (1988), using *p*-nitroanilide as substrate. Activity is expressed as nmoles of *p*-nitroaniline produced per min.

The activity of all enzymes tested was calculated either as specific activity, i.e. units of enzyme activity per mg of tissue protein, and as total activity, i.e. units of enzyme activity per total wet weight of the organ.

Some preliminary enzyme determinations were done to ensure appropriate maintenance of enzyme activity after freezing and thawing and to test kinetic conditions. In addition, to ensure zero order kinetics, all enzyme assays were run in duplicate utilizing one and twice the amount of homogenate. All those unusual assays in which duplicates were not satisfactory were repeated using smaller amounts of homogenate.

No attempts were made to identify the different types of SOD or of GPX that has been described in testis, but the procedures employed ensure that the whole activity of the different isozymes was registered.

Total protein content for the determination of the specific activities of the enzymes was measured using a commercially available bi-cinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

2.1. Statistical analysis

Comparisons among groups were made with one-way ANOVA (Sokal and Rohlf, 1995) followed by the Bonferroni post hoc test. Homogeneity of variances was tested by Bartlett and Levene tests (Sokal and Rohlf, 1995). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Realization of this work, including the use and handling of animals, was reviewed and approved by the Consejo Divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud (Biology and Health

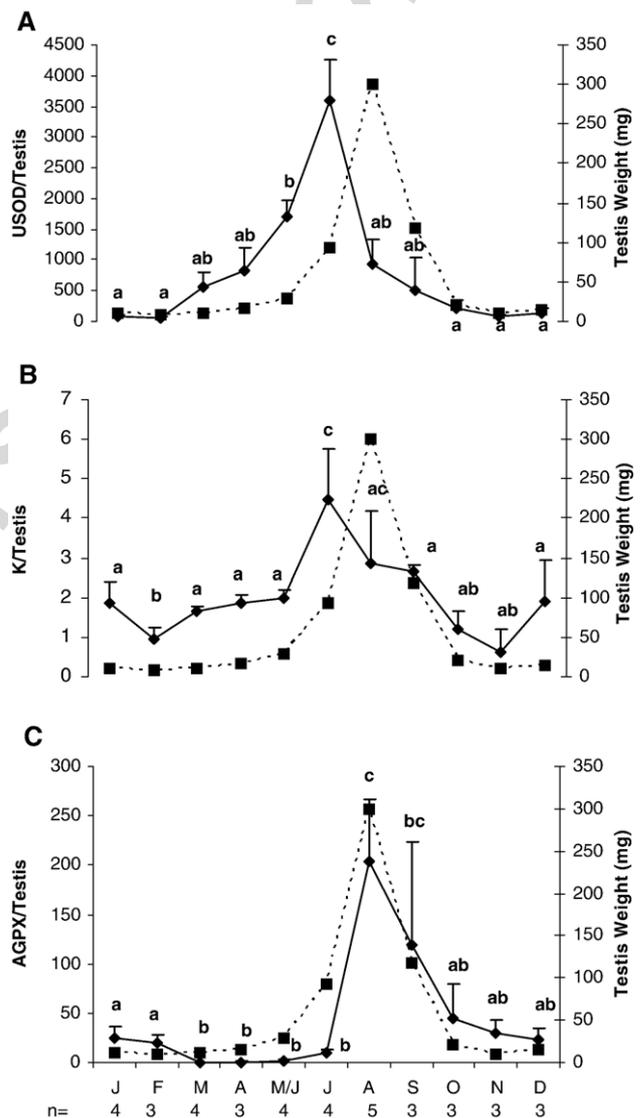


Fig. 2. ROS scavenging enzymes (expressed as total activity, i.e. units of enzyme activity per total organ weight) in *C. mexicanus* bats captured monthly during the annual reproductive cycle (see Fig. 1); (A) Superoxide dismutase, expressed as U SOD [One unit of activity is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of the formazan dye formation by 50%]; (B) Catalase, expressed as changes in K , the constant rate of the first order reaction (Cohen et al., 1970) and, (C) Glutathione peroxidase expressed as AGPX (nmol NADPH oxidized per minute). Data indicate Mean \pm SEM. Numbers in parenthesis indicate the number of bats. Different letters indicate the existence of statistical significant differences between values in the same trace (ANOVA plus Bonferroni post hoc test).

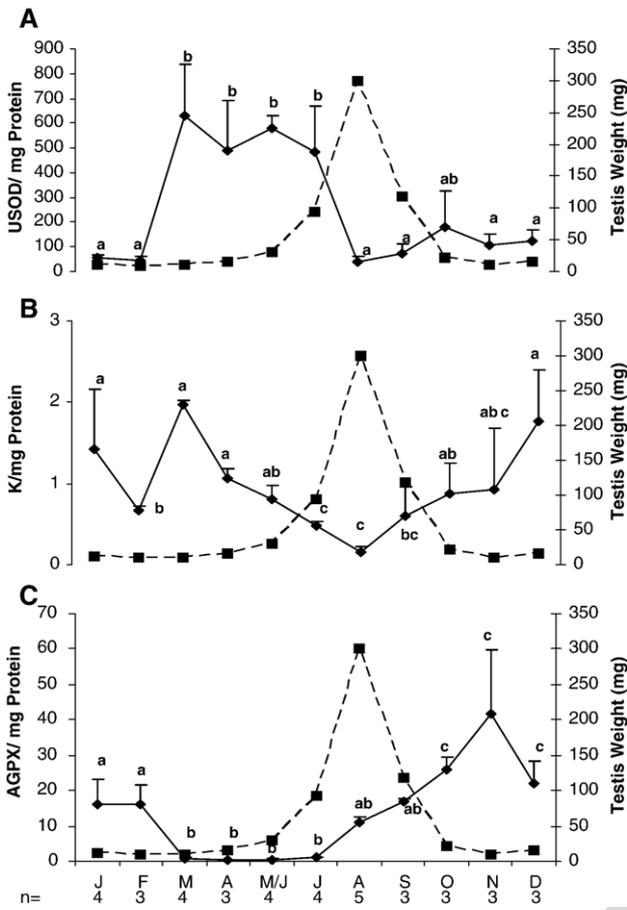


Fig. 3. ROS scavenging enzymes (expressed as specific activity, i.e. units of enzyme activity per mg of tissue protein) in *C. mexicanus* bats captured monthly during the annual reproductive cycle (see Fig. 2).

Sciences Divisional Board) of the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Animals were cared for in accordance to the “Guidelines for the capture, handling, and care of mammals” as approved by the American Society of Mammalogist (Animal Care and Use Committee, 1998).

3. Results

In total 39 adult male bats were used. Mean body mass was 7.5 g (range 7.2–8.0 g) and the mean forearm length was 41.8 mm (range 41.5–43.1 mm). Testes were permanently inguinal, their recrudescence occurs in May–June, with a peak weight in August. Afterwards testes underwent a profound involution and were totally regressed in October–November (Fig. 1). Protein concentration of the testis (Fig. 1) showed little variations through the annual cycle, but was significantly higher from January through May/June.

Fig. 2 indicates the activities of GPX, catalase, and SOD in testis expressed per total organ wet weight during the annual reproductive cycle of *C. mexicanus*. SOD activity was almost nil from October to February (Fig. 2A), increases slowly from February to April and then sharply from May to July, just when the testes showed clear indications of recrudescence. Then a sharp decrease is observed in the activity of the enzyme so that

in August, the month of full testes development, superoxide dismutase activity is 3–4 times lower than in July. Catalase activity is bimodal (Fig. 2B). The main peak of activity occurs during all the period of testicular activity from April to September. However, as in the case of SOD, a clear increase in catalase activity occurs a month before testes growth. Glutathione peroxidase total activity parallels almost exactly the testis growth cycle (Fig. 2C), increasing on July to reach a peak in August and then decreasing through September to almost disappear in October.

Changes in specific activity (activity per mg of tissue) of the three enzymes are indicated in Fig. 3. Superoxide dismutase specific activity during the annual cycle of *C. mexicanus* follows a pattern similar to that observed in the case of total activity (Fig. 3A), but the pre-testicular increase of activity, already obvious in March, remains high until July and then descends to almost nil values in August. A second, less important peak is observed in October. Specific activity of catalase (Fig. 3B), being highly irregular, seems to be particularly important during the period of testis regression, showing high values from November to January. On the other hand its lowest activity was observed during the period of testis maximal growth. A similar behavior is observed in the case of glutathione peroxidase (Fig. 3C), but the pattern is much more

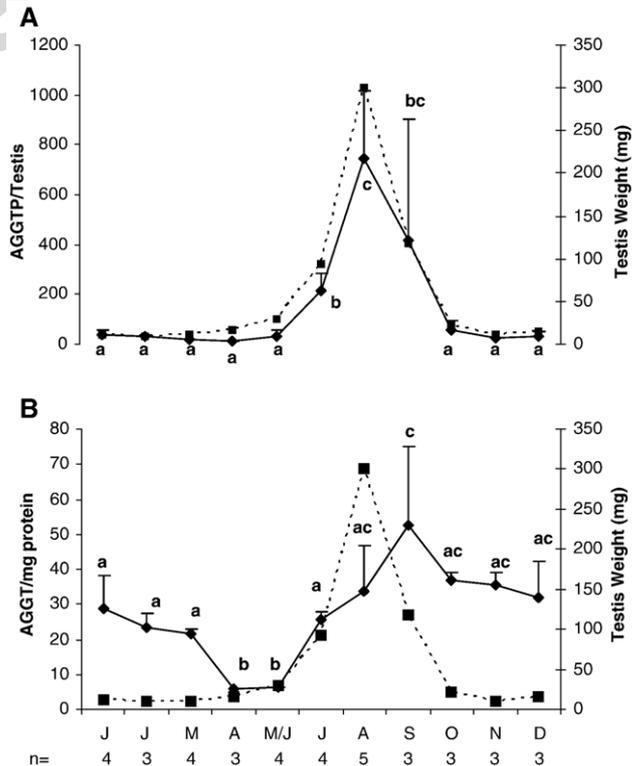


Fig. 4. Activity of GGT in the testis of *C. mexicanus* bats captured monthly during the annual reproductive cycle (see Fig. 1); (A) Activity of the enzyme expressed as total activity, i.e. units of enzyme activity per total organ weight; (B) Activity of the enzyme expressed as specific activity, i.e. units of enzyme activity per mg of tissue protein. Data indicate Mean±SEM. Numbers in parenthesis indicate the number of bats. Different letters indicate the existence of statistical significant differences between values in the same trace (ANOVA plus Bonferroni post hoc test).

regular. Enzyme activity is low from March to July, i.e. during the months of testicular recrudescence. An initial increase in activity of the enzyme can be observed in August to reach a peak in November and then decreasing slowly until March.

γ -Glutamyl transpeptidase total activity (Fig. 4A) follows a pattern almost identical to that of GPX total activity paralleling the growth of the testis. Its activity increases in July to reach a peak in August and then decreases to almost nil values in October. The specific activity of this enzyme is also similar to the pattern of GPX specific activity, but showing interesting differences: it shows a peak that begins in July reaches maximal activity in September and then decreases slowly to reach a minimum from April to June (Fig. 4B).

4. Discussion

Spontaneous germ cell death during spermatogenesis is usually observed in the mammalian testis. Although the function of this process during spermatogenesis is unclear, it apparently provides not only a mechanism to regulate the number of spermatozoa produced, but a quality control mechanism of germ cell production inducing spontaneous death of those germ cells that will give origin to anomalous spermatozoa (Boekelheide et al., 2000). It has been shown that ROS production is high in the reproductive tissues (Agarwal et al., 2003), and that apoptotic death of testicular cells is efficiently induced by oxidative stress (Buttke and Sandstrom, 1994; Tilly and Tilly, 1995; Kumagai et al., 2002). Therefore, as our data indicate, the efficient participation of antioxidant defense mechanisms, including the synergistic activity of the different types of superoxide dismutase (Peltola et al., 1992; Mruk et al., 1998), catalase and the various types of glutathione peroxidase (GPX) (Roveri et al., 1992; Brigelius-Flohé, 1999), must be important during the cycle of recrudescence–involution of spermatogenic and endocrinological testicular functions of seasonal breeding mammals.

It has been reported that the vigorous testicular growth observed from the newly born period to prepuberty in the human, is mainly mediated by a significant decrease in the number of testicular cells that experience apoptosis (Berenstein et al., 2002). Our results show that during the months that immediately precede and/or accompany testicular recrudescence in *C. mexicanus*, ROS scavenging enzymes reach their highest activities. It is then possible to postulate that testis development in seasonal reproducing mammals may be also mediated through a decrease in testicular cells apoptosis.

Specific immunoassay of PHGPX distribution in rat testis indicates that the activity of this enzyme is confined to the maturing spermatogenic cells, being specifically located either in the peripheral part of the cytoplasm, the nuclear membrane, or in the mitochondria. On the contrary, Sertoli and Leydig cells did not react with the anti-PHGPX antiserum (Roveri et al., 1992). It is important to consider this data in view of our results. In accord with the data of Roveri et al., total activity of GPX during the testicular cycle of *C. mexicanus* seems to be strictly limited to the phases of testicular recrudescence and spermatogenesis activity. However, when the enzyme activity is expressed per mg

of tissue protein, specific activity, its behavior is almost completely different, indicating that GPX must be selectively synthesized during the phases of testicular regression. We may conclude that, during testicular involution and quiescence, GPX has necessary functions in the preservation of other kinds of cells, probably Sertoli and Leydig cells (Peltola et al., 1996).

The significant activities, both total and specific, of ROS scavenging enzymes preceding and accompanying testes recrudescence, reflect the necessity to protect dividing testicular cells from oxidative damage. Considering that hydroperoxides are potent mutagenic agents, the protection offered by ROS scavengers must be particularly important during the early phases of spermatogenesis. It is actually accepted that increases in ROS concentration may affect DNA integrity (Aitken et al., 1998; Aitken and Krausz, 2001; Ford, 2004; Rivlin et al., 2004). The protective activity of Cu/Zn SOD and GPX in developing spermatids and spermatozoa has been noted in several species and under different conditions (Cai et al., 1997; Miura et al., 2002; Krishnamoorthy et al., 2005), particularly against oxidative stress (Ikeda et al., 1999; Kumagai et al., 2002). Total testicular activity of the ROS scavenging enzymes reflects the relevance of its participation during testis recrudescence in *C. mexicanus*. In fact, SOD and catalase are mainly active during the early period of testes development, while GPX follows, almost exactly, the weight changes observed during the growth–involution process of the testis. It is particularly important to observe the pattern of catalase total activity: it is high when SOD activity is high. Afterwards, when SOD activity decreases, catalase activity also decreases, but is kept significantly high during all the time that the spermatogenic function of the testis may be considered active.

In seasonally reproducing bats, pituitary gonadotrophins and testosterone are usually secreted in rigorous harmony with testicular growth (Martin and Bernard, 2000). This same behavior can be observed in most of the per organ activities of ROS scavenging enzymes during the reproductive cycle of *C. mexicanus*. They increase slightly before (SOD and catalase), or during the period of testicular recrudescence (GPX), and decrease with testis involution. It is worth mentioning that the total activity of GGT, as the total activity of GPX, follows almost exactly the pattern of testicular weight growth during recrudescence. In relation with this similarity between the activities of GPX and GGT, we may remember that the intracellular level of GSH participates in several important ways in the normal sperm maturation process (Spencer et al., 1995; Pfeifer et al., 2001). It has been shown that generation of $O_2^{\bullet -}$, produced fundamentally by SOD activity, reduces the intracellular levels of GSH (Spencer et al., 1995). Reduced glutathione levels may be important in the initiation of chromatin compaction and DNA stabilization during spermiogenesis. Under these conditions GPX isozymes, particularly PHGPX, would prefer to utilize protamine thiol groups as substrates instead of glutathione (Pfeifer et al., 2001). However, reduced glutathione levels can induce apoptosis in target cells either directly or indirectly (Spencer et al., 1995).

Finally, it is important to mention that the patterns of scavenging testicular enzyme activities, when expressed as specific

activity (activity per mg protein) are very similar to the pattern found by us in the different regions of the epididymis of the same species (Arenas-Ríos et al., 2005), particularly during the maturation phase of the epididymal cycle. This similarity may point out the existence of similar regulatory mechanisms in testes and epididymis, or, more important, the necessary participation of testes in the synthesis of antioxidant enzymes to be used, after secretion, within the epididymal environment.

Jow et al. (1993) showed that Cu/Zn SOD changes its tissular distribution during testis development, from a uniform distribution in prepubertal rats, to a stage-specific pattern of expression in mature and older animals. In adult animals Cu/Zn SOD mRNA was preferentially synthesized in seminiferous tubules of stages VI–VIII, suggesting that Cu/Zn SOD is probably required during the process of spermiation. Our data are not in accord with this proposal. In *C. mexicanus* SOD testicular activity, both total and specific, is important before or justly when testicular growth is beginning, and is very low at those times in which spermiation could be expected.

A number of studies have suggested that ROS can affect critical events associated with steroidogenesis (Stocco et al., 1993; Diemer et al., 2003; Luo et al., 2006). Age-related decreases in antioxidant enzymes in Leydig and adrenocortical cells (Zirkin and Chen, 2000; Chen et al., 2001; Luo et al., 2006), demonstrate that ROS may be involved in the steroidogenic function of Leydig cells. It is important then to mention that Kumar et al. (1990) suggested that SOD may act as an alternate regulatory switch in testicular steroidogenesis. Leydig cells function and testosterone synthesis in seasonal reproducing *vespertilionids* appears to be coordinated with the increase in testis size and with spermatogenesis. The important levels of ROS scavenging enzymes that precede and accompany initial testis development in *C. mexicanus*, especially catalase, might be related in part, with an anti-ROS protective activity upon the viability and functioning of Leydig cells.

Sertoli cells are essential for the development and maintenance of testicular function (McLaren, 2000). It has been shown that the capability of the adult testis to generate an adequate number of spermatids depends on the number of Sertoli cells produced during testis development (Orth et al., 1988). Therefore, maintenance of Sertoli cell number and activity during testicular involution and quiescence in seasonal breeders must be crucial for the regression to normal adult fertility. Sertoli cells seems to be quite resistant to the effects of oxygen stress mainly because they make reduced use of mitochondria electron transport activity, processing glucose anaerobically (Robinson and Fritz, 1981; Erkkilä et al., 2003; Brauchi et al., 2005).

Sertoli cells have been reported to possess a complete antioxidative defense system characterized by high levels of intracellular GSH and α -tocopherol, together with important activities of SOD, classical GPX, Se-PHGPX (Bauché et al., 1994; Mruk et al., 2002), and a less important activity of catalase. We may also remember that in the regulation of Sertoli cell GGT activity the presence of germ cell derived products seems to be as important as the presence of FSH and testosterone secretion (Schteingart et al., 1988, 2002). In relation to this, our data show: first, that GGT, both total and specific,

activities during testis involution and quiescence are strictly paralleled by GPX activity and, second, that during testis inactivity SOD and catalase specific activities are kept high. These results show that Sertoli cells are continuously protected against ROS damage by preferentially synthesizing scavenger enzymes during the long months of testis inactivity and probably when testis spermatogenic activity begins. We may also propose that the parallelism found between GPX and GGT total activities in relation with testis growth and spermatogenic activity might be related to an important participation of these enzymes in the regulation of Sertoli cell–germ cell interactions (Schteingart et al., 1988, 1989).

In 1999, Ursini et al. discovered that in late sperm maturation PHGPX plays a dual role. It acts as an ROS scavenging enzyme in early spermatogenic cells and as a structural protein in elongating spermatids and in spermatozoa. In late spermatogenesis PHGPX is capable of utilizing its own protein-SH groups (and those of other proteins) to form intermolecular cross-links and form the keratin-like material that comprises the basic component of the mitochondrial capsule in the midpiece of the sperm cells. In fact, this isozyme of GPX is really the mitochondrial seleno-protein peculiar to mammalian spermatozoa and therefore responsible for all the sperm alterations observed in selenium deficiency animals (Foresta et al., 2002). NagDas et al. (2005) suggest that tyrosine-phosphorylation of the PHGPX forming the mitochondrial cover might be related to the tyrosine phosphorylation that has been described as fundamental during the hyper activation and capacitation of spermatozoa (Visconti and Kopf, 1998). It is interesting to correlate these facts with the peculiar behavior of the GPX and GGT during the testicular cycle of *C. mexicanus*. When total activity is considered both enzymes are expressed in almost complete concordance with testicular growth, indicating the importance of these enzymes during germ cell development and differentiation. When testicular regression begins it is important to observe that the specific activity of both enzymes show a significant increase that may be related to the changes in redox activity observed during advanced spermatogenesis (Bauché et al., 1994) and with the formation of the mitochondrial capsule.

Recent studies show that redox signaling plays an important role in the growth factor-induced mitogenic stimulation required during the conversion of dormant to proliferating cells. Shackelford et al. (2000) and Menon et al. (2003) have shown that redox-sensitive signaling regulates the entrance of cells into the mitotic cycle, particularly controlling the activation of G₁-regulatory proteins that stimulate the progression from early G₁ into S phase. In relation to these facts our results indicate, on the one hand, that during testicular recrudescence in *C. mexicanus*, SOD total activity is particularly high during the early phases of testis growth. On the other hand, we may observe that the relative high protein concentration during the month of March can be correlated with the apparition of high specific activity of SOD, activity that is kept high from March to June, period in which proliferation of testicular cells must be induced and/or stimulated. During this period GPX is low or absent and the specific and total activities of catalase, with the possible exception of the specific activity in March, are kept consistently low.

NagDas et al. (2005) suggest that tyrosine-phosphorylation of the PHGPX forming the mitochondrial cover might be related to the tyrosine phosphorylation that has been described as fundamental during the hyper activation and capacitation of spermatozoa (Visconti and Kopf, 1998). It is interesting to correlate these facts with the peculiar behavior of the GPX and GGT during the testicular cycle of *C. mexicanus*. When total activity is considered both enzymes are expressed in almost complete concordance with testicular growth, indicating the importance of these enzymes during germ cell development and differentiation. When testicular regression began it is important to observe that the specific activity of both enzymes shows a significant increase that may be related to the changes in redox activity observed during advanced spermatogenesis (Bauché et al., 1994) and with the formation of the mitochondrial capsule.

Recent studies show that redox signaling plays an important role in the growth factor-induced mitogenic stimulation required during the conversion of dormant to proliferating cells. Shackelford et al. (2000) and Menon et al. (2003) have shown that redox-sensitive signaling regulates the entrance of cells into the mitotic cycle, particularly controlling the activation of G₁-regulatory proteins that stimulate the progression from early G₁ into S phase. In relation to these facts our results indicate, on the one hand, that during testicular recrudescence in *C. mexicanus*, SOD total activity is particularly high during the early phases of testis growth. On the other hand, we may observe that the relative high protein concentration during the month of March can be correlated with the apparition of high specific activity of SOD, activity that is kept high from March to June, period in which proliferation of testicular cells must be induced and/or stimulated. During this period GPX is low or absent and the specific and total activities of catalase, with the possible exception of the specific activity in March, are kept consistently low.

In conclusion, the present study increment our insight into the effectiveness of antioxidant mechanisms as key contributors during the processes that are involved in the testis recrudescence–involution machinery that accompany cyclic reproduction in seasonal breeding bats, as well as in other types of mammalian species with this type of reproduction. We also confirm that the concept of scavenging enzymes given to SOD, GPX and catalase must be enhanced in view of their participation as regulators of several basic cellular processes, as mitosis and differentiation. Further studies might precise the cell and subcellular levels at which ‘antioxidant enzymes’ specifically must act in the regulation of this fundamental process.

Acknowledgements

This work was supported partially by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca crédito No. 169578 and convenio No. 400200-5-31743-N).

References

Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A., 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79, 829–843.

- Aitken, R.J., Krausz, C., 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122, 497–506.
- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, S., 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59, 1037–1046.
- Animal Care and Use Committee, 1998. Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *J. Mammal.* 79, 1416–1431.
- Arenas-Ríos, E., León-Galván, M.A., Mercado, P.E., Rosado, A., 2005. Superoxide dismutase, cabalase, and glutathione peroxidase during epididimal maturation and prolonged storage of spermatozoa in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Can. J. Zool.* 83, 1556–1565.
- Bauché, F., Fouchard, B., Jégou, B., 1994. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett.* 349, 392–396.
- Berenstein, E.B., Sciara, M.I., Rivarola, M.A., Belgorosky, A., 2002. Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: high rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5113–5118.
- Blanco-Rodríguez, J., Martínez-García, C., 1996. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif.* 29, 13–31.
- Boekelheide, K., Fleming, S.L., Johnson, K.J., Patel, S.R., Heidi, A., 2000. Role of sertoli cells in injury-associated testicular cell apoptosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225, 105–115.
- Bogdanska, J.J., Korjeti, P., Todorova, B., 2003. Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia. *Bratisl Lek. Listy* 104, 108–114.
- Brauchi, S., Rauch, M.C., Alfaro, I.E., Cea, C., Concha, I.I., Benos, D.J., Reyes, J.G., 2005. Kinetics, molecular basis, and differentiation of L-lactate transport in spermatogenic cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 288 (3), C523–C534.
- Brielsemeier, M., Bechet, J.M., Suppmann, S., Conrad, M., Laux, G., Bornkamm, G.W., 2001. Cloning of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) as an antiapoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells. *BioFactors* 14, 179–190.
- Brigelius-Flohé, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 951–965.
- Buttke, T.M., Sandstrom, P.A., 1994. Oxidative stress as mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15, 7–10.
- Cai, L., Hales, B.F., Robaire, B., 1997. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol. Reprod.* 56, 1490–1497.
- Carreau, S., Drosdowsky, M.A., Foucault, P., 1996. Enzymatic properties of adult human Sertoli cells in vitro. *Andrologia* 28, 89–95.
- Chang, W.C., 2003. Identification of an endogenous inhibitor of arachidonate metabolism in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J. Biomed. Sci.* 10, 599–606.
- Chen, H., Cangello, D., Benson, S., Folmer, J., Zhu, H., Trush, M.A., Zirkin, B.R., 2001. Age-related increase in mitochondrial superoxide generation in the testosterone-producing cells of Brown Norway rat testes: relationship to reduced steroidogenic function? *Exp. Gerontol.* 36, 1361–1373.
- Cohen, G., Dembiec, D., Marcus, J., 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Measurement of catalase activity in tissue extracts.* *Anal. Biochem.* 34, 30–38.
- Diemer, T., Allen, J.A., Hales, K.H., Hales, D.B., 2003. Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and Inhibits Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology* 144, 2882–2891.
- Erkkila, K.L., Suomalainen, M., Wikstro, M., Parvinen, M., Dunkel, L., 2003. Chemical anoxia delays germ cell apoptosis in the human testis. *Biol. Reprod.* 69, 617–626.
- Finkel, T., 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248–253.
- Ford, W.C.L., 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Updat.* 10, 387–399.
- Foresta, C., Flohé, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F., Maiorino, M., 2002. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol. Reprod.* 67, 967–971.

- Forman, E.U., Skelton, D.C., 1990. Protection of alveolar macrophages from hyperoxia by γ -glutamyl transpeptidase. *Am. J. Physiol.* 259, L102–L107.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., Ishii, T., 2003. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J. Androl.* 5, 231–242.
- Furuta, I., Porkka-Heiskanen, T., Scarbrough, K., Tapanainen, J., Turek, F.W., Hsueh, A.J., 1994. Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djungarian hamsters. *Biol. Reprod.* 51, 1315–1321.
- Hanigan, M.H., Ricketts, W.A., 1993. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 32, 6302–6306.
- Hodgen, G.D., Sherins, R.J., 1973. Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat. *Endocrinology* 93, 985–989.
- Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., Tanaka, T., 1999. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol. Reprod.* 61, 393–399.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Scollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-Clermont, P.J., 1997. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275, 1649–1652.
- Jow, W.W., Schlegel, P.N., Cichon, Z., Phillips, D., Goldstein, M., Bardin, C.W., 1993. Identification and localization of copper–zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. *J. Androl.* 14, 439–447.
- Krishnamoorthy, G., Murugesan, P., Muthuvel, R., Gunadharini, D.N., Vijayababu, M.R., Arunkumar, A., Venkataraman, P., Aruldas, M.M., Arunakaran, J., 2005. Effect of Aroclor 1254 on Sertoli cellular antioxidant system, androgen binding protein and lactate in adult rat in vitro. *Toxicology* 212, 195–205.
- Krutzsch, P.H., 2000. Anatomy, physiology and cyclicity of the male reproductive tract. In: Crichton, E.G., Krutzsch, P.H. (Eds.), *Reproductive Biology of Bats*. Academic Press, London, pp. 91–155.
- Kukucka, M.A., Misra, H.P., 1993. The antioxidant defense system of isolated guinea pig Leydig cells. *Mol. Cell. Biochem.* 126, 1–7.
- Kumagai, A., Kodama, H., Kumagai, J., Fukuda, J., Kawamura, K., Tanikawa, H., Sato, N., Tanaka, T., 2002. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 118–123.
- Kumar, G.P., Seerwani, N., Laloraya, M., Nivsarkar, M., Verma, S., Singh, A., 1990. Superoxide dismutase as a regulatory switch in mammalian testicular steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 302–308.
- Kunz, T.H., Anthony, E.L.P., 1982. Age estimation and post-natal growth in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *J. Mammal.* 63, 23–32.
- León-Galván, M.A., Fonseca, T., López-Wilchis, R., Rosado, A., 1999. Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Can. J. Zool.* 77, 7–12.
- León-Galván, M.A., López-Wilchis, R., Hernández, P.O., Arenas, R.E., Rosado, A., 2005. Male reproductive cycle of the Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: vespertilionidae). *Southwest Nat.* 50, 453–460.
- Li, S., Yan, T., Yang, J.K., Oberley, T.D., Oberley, L.W., 2000. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 60, 3927–3939.
- López-Wilchis, R., 1989. Biología de *Plecotus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae) en el Estado de Tlaxcala. México. Doctoral thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Lu, C., Steinberger, A., 1977. Gamma-glutamyl transpeptidase activity in the developing rat testis. Enzyme localization in isolated cell types. *Biol. Reprod.* 17, 84–88.
- Luo, L., Chen, H., Trush, M.A., Show, M.D., Anway, M.D., Zirkin, B.R., 2006. Aging and the brown Norway rat Leydig cell antioxidant defense system. *J. Androl.* 27, 240–247.
- Maiorino, M., Wissing, J.B., Brigelius-Flohé, R., Calabrese, F., Roveri, A., Steinert, P., Ursini, F., Flohé, L., 1998. Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPX by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J.* 12 (13), 1359–1370.
- Markey, C.M., Rudolph, D.B., Labus, J.C., Hinton, B.T., 1998. Oxidative stress differentially regulates the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs in the initial segment of the rat epididymis. *J. Androl.* 19, 92–99.
- Martin, L., Bernard, R.T.F., 2000. Endocrine regulation of reproduction in bats: the role of circulating gonadal hormones. In: Crichton, E.G., Krutzsch, P.H. (Eds.), *Reproductive Biology of Bats*. Academic Press, London, pp. 27–64.
- McLaren, A., 2000. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163, 3–9.
- Menon, S.G., Sarsour, E.H., Spitz, D.R., Higashikubo, R., Sturm, M., Zhang, H., Goswami, P.C., 2003. Redox regulation of the G₁ to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. *Cancer Res.* 63, 2109–2117.
- Miura, M., Sasagawa, I., Suzuki, Y., Nakada, T., Fujii, J., 2002. Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in mouse testis following heat exposure. *Fertil. Steril.* 77, 787–793.
- Mruk, D., Cheng, C., Cheng, Y., Mo, M., Grima, J., Silvestrini, B., Lee, W.M., Cheng, C.Y., 1998. Rat testicular extracellular superoxide dismutase: its purification, cellular distribution, and regulation. *Biol. Reprod.* 59, 298–308.
- Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M.Y., Cheng, C.Y., 2002. Antioxidant superoxide dismutase — a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 65 (4), 305–311.
- NagDas, S.K., Winfrey, V.P., Olson, G.E., 2005. Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX), during hamster sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 72, 164–171.
- Nair, R., Shaha, C., 2003. Diethylstilbestrol induces rat spermatogenic cell apoptosis *in vivo* through increased expression of spermatogenic cell fas/fasL system. *J. Biol. Chem.* 278, 6470–6481.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Arai, M., Nakagawa, Y., 1999. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 29294–29302.
- Nonclercq, D., Reverse, D., Toubeau, G., Beckers, J.F., Sulon, J., Laurent, G., Zanen, J., Heuson-Stiennon, J.A., 1996. In situ demonstration of germinal cell apoptosis during diethylstilbestrol-induced testis regression in adult male Syrian hamsters. *Biol. Reprod.* 55, 1368–1376.
- Ojha, P., Dhar, J.D., Dwivedi, A.K., Singh, R.L., Gupta, G., 2006. Effect of antispermatogenic agents on cell marker enzymes of rat Sertoli cells in vitro. *Contraception* 73, 102–106.
- Orth, J.M., Gonsalvus, G.L., Lamperti, A.A., 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122, 787–794.
- Peltola, V., Huhtaniemi, I., Ahotupa, M., 1992. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J. Androl.* 13, 450–455.
- Peltola, V., Huhtaniemi, I., Metsä-Ketela, Ahotupa, M., 1996. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 137, 105–112.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W., Bornkamm, G.W., Behne, D., 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* 15, 1236–12368.
- Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., Breitbart, H., 2004. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 70, 518–522.
- Robinson, R., Fritz, I.B., 1981. Metabolism of glucose by sertoli cells in culture. *Biol. Reprod.* 24, 1032–1041.
- Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P., Calligaro, A., Ursini, F., 1992. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J. Biol. Chem.* 267 (9), 6142–6146.
- Schteingart, H.F., Cigorraga, S.B., León, M., Moya, S., Pellizzari, E., Chemes, H., Rivarola, R.A., 1988. Hormonal regulation of rat testicular g-glutamyl transpeptidase *in vivo* and *in vitro*. *Andrologia* 20 (4), 351–359.
- Schteingart, H.F., Rivarola, M.A., Cigorraga, S.B., 1989. Hormonal and paracrine regulation of g-glutamyl transpeptidase in rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 67, 73–80.
- Schteingart, H.F., Cigorraga, S.B., Calandra, R.S., Gonzalez-Calvar, S.I., 2002. Modulation by polyamines of gamma-glutamyl transpeptidase activity and lactate production in cultured Sertoli cells from immature and adult regressed golden hamster. *Endocr. Res.* 28 (3), 239–255.

- Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., Paules, R.S., 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1387–1404.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry*. Edited by W. H. Freeman and Co., N.Y.
- Spencer, J.P., Jenner, P., Halliwell, B., 1995. Superoxide dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease. *NeuroReport* 6 (11), 1480–1484.
- Stocco, D.M., Wells, J., Clark, B.J., 1993. The effects of hydrogen peroxide on steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 133, 2827–2832.
- Štrbenc, M., Fazarinc, G., Bavdek, S.V., Pogačnik, A., 2003. Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europaeus* L.). *Anat. Histol. Embryol.* 32, 48–53.
- Tilly, J.L., Tilly, K.I., 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136, 242–252.
- Visconti, P.E., Kopf, G.S., 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59, 1–6.
- Wang, H.P., Schafer, F.Q., Goswami, P.C., Oberley, L.W., Buettner, G.R., 2003. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induces a delay in G1 of the cell cycle. *Free Radic. Res.* 37, 621–630.
- Yang, J.Q., Buettner, G.R., Domann, F.E., Li, Q., Engelhardt, J.F., Weydert, C.D., Oberley, L.W., 2002. v-Ha-ras mitogenic signaling through superoxide and derived reactive oxygen species. *Mol. Carcinog.* 33, 206–218.
- Yash, P.A., Tapani, V.P., 1988. Gamma-glutamyl transpeptidase, glutathione and L-glutamic acid in the rat epididymis during postnatal development. *Biol. Reprod.* 38, 996–1000.
- Young, K.A., Nelson, R.J., 2001. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction* 122, 677–685.
- Zirkin, B.R., Chen, H., 2000. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol. Reprod.* 63, 977–981.

Author's personal copy

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal A, Saleh RA y Bedaiwy MA (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79: 829–843.
- Aitken RJ (1999). The Amoroso lecture. The human spermatozoon- a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 115(1):1–7.
- Aitken RJ (2000). Possible redox regulation of sperm motility activation. *J Androl* 21:491-496.
- Aitken RJ, Buckingham DW y West KM (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa—analysis of the cellular mechanisms involved in luminol-dependent and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cellular Physiol* 151:466–477.
- Aitken RJ y Clarkson JS (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81:459-469.
- Aitken RJ, Clarkson JS y Fishel S (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 41:183–197.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B y 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: 468–482.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z y Irvine D (1998a). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59:1037–1046.

- Aitken, RJ, Harkiss D y Buckingham DW (1993a). Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 35: 302–315.
- Aitken RJ, Harkiss D y Buckingham D (1993b). Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* 98: 257–265.
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M y Irvine D (1998b). A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* 111:645–656.
- Aitken RJ, Irvine DS y Wu FC (1991). Prospective analysis of spermocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 164:542-551.
- Aitken RJ y Krausz C (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497–506.
- Aitken RJ, Krausz C y Buckingham D (1994). Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ-cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* 39:268–279.
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW y van Duin M (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 108:2017-2025.
- Aitken RJ, Ryan AL, Baker MA y McLaughlin EA (2004). Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radical Biol Med* 36:994–1010.

- Aitken RJ, Ryan AL, Curry BJ y Baker MA (2003). Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 9:645–661.
- Aitken RJ y Vernet P (1998). Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *J Reprod Fertil* 53(Suppl.): 109–118.
- Aitken RJ y West KM (1990). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 13(6): 433–451.
- Alvarez JG y Storey BT (1982). Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod* 27: 1102–1108.
- Alvarez JG y Storey BT (1984). Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 30:833-841
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L y Storey BT (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8:338-348
- Anthony ELP (1988). Age determination in bats. In: H. T. Kunz, editor. Ecological and behavioral methods for the study of bats. Smithsonian Institution Press, Washington D. C. Pp 47–58.
- Arenas- Ríos E, León-Galván MA, Mercado PE, López-Wilchis R, Cervantes DLI y Rosado GA (2007). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology; Part A* 148:150-158
- Arenas- Ríos E, León-Galván MA, Mercado PE y Rosado GA (2005). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase during epididymal maturation and

- prolonged storage of spermatozoa in the mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Canadian Journal of Zoology* 83:1556-1565
- Arthur JR y Boyne R (1985). *Life Scien* 36:1569-1575
- Avery MI (1985). Winter activity of pipistrelle bats. *J Anim Ecol* 54(3):721–738.
- Babior BM (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476.
- Babior BM, El Benna J, Chanock SJ y Smith RM (1997). The NADPH oxidase of leukocytes: The respiratory burst oxidase. In Scandalios JG (ed) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 737-784
- Baker MA y Aitken RJ (2005). Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 67-75
- Baker MA, Krutskikh A, Curry BJ, Hetherington L y Aitken RJ (2005). Identification of cytochrome-b5 reductase as the enzyme responsible for NADH-dependent lucigenin chemiluminescence in human spermatozoa. *Biol Reprod* 73: 334–342.
- Baker MA, Krutskikh A, Curry BJ, McLaughlin EA y Aitken RJ (2004). Identification of cytochrome p450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations. *Biol Reprod*. 71:307-318.
- Baker MA, Reeves G, Hetherington L, Muller J, Baur I y Aitken RJ (2007). Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS /MS analysis. *Proteomics – Clinical Applications* 1:524–532.

- Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH y Cox JA (2004). Mechanism of Ca^{2+} activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 279:18583-18591.
- Barber AA y Bernheim F (1967). Lipid peroxidation. Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. *Adv Gerontol Res* 2: 355-403.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD y Raff MC (1992). Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol* 23(9): 1221-1230.
- Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejdr P, Seed MC y Thomas M (1983). Flow Cytometry studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology* 130(4): 1910-1917.
- Bathgate ADR, Aaron JW, Hsueh, y Sherwood DO (2002). Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod* 67: 967-971.
- Bauché F, Fouchard B y Jégou B (1994). Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett* 349:392-396.
- Bauskin AR, Alkalay I y Ben-Neriah Y (1991). Redox regulation of a protein tyrosine kinase in the endoplasmic reticulum. *Cell* 66(4): 685-696.
- Bennetts LE y Aitken RJ (2005). A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 71: 77-87.
- Berenstein EB, Sciara MI, Rivarola MA y Belgorosky A (2002). Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: high rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5113-5118.

- Bilodeau OJF, Chattierjee S, Marc-Andre S y Gagnon C (2000). Levels of Antioxidant Defenses Are Decreased in Bovine Spermatozoa After a Cycle of Freezing and Thawing. *Mol Reprod Develop* 55: 282–288.
- Blackmore PF (1993). Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca^{2+} influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signalling* 5:531–538.
- Brauchi S, Rauch MC, Alfaro IE, Cea C, Concha II, Benos DJ y Reyes JG (2005). Kinetics, molecular basis, and differentiation of L-lactate transport in spermatogenic cells. *Am J Physiol, Cell Physiol* 288(3): C523–C534.
- Brielmeier M, Bechet JM, Suppmann S, Conrad M, Laux G y Bornkamm GW (2001). Cloning of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) as an antiapoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells. *BioFactors* 14:179–190.
- Brigelius-Flohé R (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27: 951–965.
- Buttke TM y Sandstrom PA (1994). Oxidative stress as mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15:7–10.
- Cai L, Hales BF y Robaire B (1997). Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod* 56:1490-1497
- Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G y Ramponi G (1998). The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H_2O_2 . *J Biol Chem* 273:32554–32560.
- Cathcart R, Schwiers E y Ames BN (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Annals of Biochemistry and Experimental Medicine* 134(1): 111–116.

- Cervantes DLI, Arenas-Ríos E, León-Galván MA, López-Wilchis R, Ambríz GD y Rosado GA (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine* 54:196-204.
- Chen H, Cangello D, Benson S, Folmer J, Zhu H, Trush MA y Zirkin BR (2001). Age-related increase in mitochondrial superoxide generation in the testosterone-producing cells of Brown Norway rat testes: relationship to reduced steroidogenic function? *Exp Gerontol* 36: 1361–1373.
- Chen H, Cheung MPL, Chow ALM, Liu W y O WS (2002). Protection of sperm DNA against oxidative stress *in vivo* by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction* 124: 491-499.
- Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ y Vaz ADN (1992). Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEB J* 6:669–673.
- Cooper TG (1995). Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Adv Exp Med Biol* 377:87–101.
- Cooper TG (1999). Epididymis. In: E. Knobil y D. J. Neill, editors. *Encyclopedia of reproduction*, volume 2. Academic Press, San Diego, California. Pp 1–17.
- Crichton EG, Hinton BT, Pallone TL y Hammerstedt R (1994). Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *Am J Physiol* 267:R1363–R1370.
- Crichton EG, Krutzsch PH y Yanagimachi R (1993). Stability of the sperm plasma membrane of hibernating bats (*Myotis velifer*) compared with other mammals. *J Reprod Fertil* 97:1–4.

- de Lamirande E y Gagnon C (1992a). Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 13(5): 368–378.
- de Lamirande E y Gagnon C (1992b). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 13(5): 379–386.
- de Lamirande E y Gagnon C (1993a). Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of a oxidative process. *Free Rad Biol Med* 14:155-166.
- de Lamirande E y Gagnon CA (1993b). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 16: 21–25.
- de Lamirande E y Gagnon CA (1995). Capacitation associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Biol Med* 18: 487–495.
- de Lamirande E y Gagnon C (1998). Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulfide groups on human sperm capacitation and superoxide production. *Free Radic Biol Med* 25:803–817.
- de Lamirande E y Gagnon C (2002). The extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol Hum Reprod* 8(2): 124–135.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H y Gagnon C (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2: 48–54.
- Diemer T, Allen JA, Hales KH y Hales DB (2003). Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and Inhibits Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology* 144: 2882–2891.

- Domínguez MMA (2007). Determinación de la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa en plasma seminal del cerdo criollo del istmo de Tehuantepec (*Sus scrofa*) Universidad Autónoma “Benito Juárez de Oaxaca”, Oaxaca, México.
- Ecroyd HW, Jones RC y Aitken RJ (2003). Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation. *Biol Reprod* 69(1): 347–354.
- Entwhistle CA, Racey PA y Speakman JR (1998). The reproductive cycle and determination of sexual maturity in male brown long-eared bats, *Plecotus auritus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Zoology, London* 244:63–70.
- Erkkilä KL, Suomalainen M, Wikström M, Parvonen M y Dunkel L (2003). Chemical anoxia delays germ cell apoptosis in the human testis. *Biol Reprod* 69: 617–626.
- Fialkow L, Chan CK, Grinstein S y Downey GP (1993). Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 268(23): 17131–17137.
- Finkel T (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10:248–253.
- Fisher HM y Aitken RJ (1997). Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool* 277:390-400.
- Ford WCL (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update* 10(5): 387–399
- Foresta C, Flohe L, Garolla A, Roveri A, Ursini F y Maiorino M (2002). Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biology of Reproduction* 67:967–971.

- Fuentes-Mascorro G, Serrano FH y Rosado GA (2000). *Arch Androl* 45:215-225.
- Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S y Ishii T (2003). Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl* 5:231-242
- Furuta L, Porkka T, Scarbrough K, Tapanainen J, Turek FW y Hsueh AJW (1994). Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djungarian hamster. *Biol Reprod* 51:1315-1321
- Gamou S y Shimizu N (1995). Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett* 357:161-164.
- Ghyselinck NB y Dufaure JP (1990). A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res* 18:7144.
- Gill-Guzman E, Ollero M, López MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ, y Agarwall A (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 16 (9):1922-1930.
- Godeas C, Tramer F, Micali F, Soranzo M, Sandri G y Panfili E (1997). Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 57:1502-1508.
- Gómez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS y Aitken RJ (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: Correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 17:276-287.
- Gómez E, Irvine DS y Aitken RJ (1998). Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl* 21: 81-94.

- Gopalakrishna A y Bhatia D (1980). Storage of spermatozoa in the epididymis of the bat *Hipposideros speoris* (Schneider). *Curr Sci (Bangalore)* 49:951–953.
- Griveau JF y LeLannou D (1997). Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. *Int J Androl* 20: 195–200.
- Griveau JF, Renard P y Le Lannou D (1995). Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. *Int J Androl* 18: 67–74.
- Gu W y Hecht NB (1996). Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J Androl* 17(3): 256–262.
- Gustafson AW (1979). Male reproductive patterns in hibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility* 56:317–331.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q y Holbrook NJ (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271:4138–4142.
- Haffetz D, Bushkin I, Dror R y Zick Y (1990). The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* 265:2896–2902.
- Halliwell B y Aruoma OI (1991). DNA damage by oxygen-derived species, Its mechanism and measured in mammalian system. *FEBS letters* 281: 9-19.
- Halliwell B y Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn. Oxford University Press, Oxford

- Holland MK, Alvarez JG y Storey BT (1981). Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa. *Biochem J* 198:273-280.
- Holland MK, Alvarez JG y Storey BT (1982). Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal sperm. *Biol Reprod* 27:1109-1118.
- Holthe MR, Staff AC, Berge LN y Lyberg T (2004). Leukocyte adhesion molecules and reactive oxygen species in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 103:913-922.
- Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M y Kumagai J (1999). Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 61:393-399.
- Irani K, Xia Y, Zweier JL, Scollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T y Goldschmidt-Clermont PJ (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275: 1649–1652.
- Iwasaki A y Gagnon C (1992). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 57:409–416.
- Jervis KM y Robaire B (2001). Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod* 65:696–703.
- Jeulin C, Soufir JC, Laval-Martin D y Calvayrac R (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res* 24:185–196.
- Jiménez C, Lefrancois AM, Ghyselinck NB y Dufaure JP (1992). Characterization and hormonal regulation of 24 kDa protein synthesis by the adult murine epididymis. *J Endocrinol* 133:197–203.

- Johnson L, Petty CS y Neaves WB (1983). Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol Reprod* 29:207-215
- Johnson L y Varner DD (1988). Effect of daily sperm production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biol Reprod* 39:812–817.
- Jones R (2004). Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol Reprod* 71:1405-1411
- Jones R, Mann T y 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, 531-537.
- Jow WW, Schlegel PN, Cichon Z, Phillips D, Goldstein M y Bardin CW (1993). Identification and localization of copper–zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. *J Androl* 14: 439–447.
- Karim KB y Banerjee S (1985). Storage of spermatozoa in the epididymis of the tropical bat, *Rhinopoma hardwickei hardwickei* (Gray). *Anat Rec* 211:95A. [Abstract: Yamaguchi H, Fukuda R, Kasai J y Tanaka T (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 68(3):519–524.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H y Tanaka (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility* 68: 519-524.
- Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan SL y Aitken RJ (1994). Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides - relationships with motility and fertilization invitro. *Fertil Steril* 62:599–605.

- Krausz C, West K, Buckingham D y Aitken RJ (1992). Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leukocytes. *Fertil Steril* 57:1317–1325.
- Krishna A y Singh K (1997). The relationship between testicular activity, accessory sex glands, and circulating steroid concentration during the reproductive cycle in a male Indian vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Canadian Journal of Zoology* 75:1042–1050.
- Krishnamoorthy G, Murugesan P, Muthuvel R, Gunadharini DN, Vijayababu MR, Arunkumar A, Venkataraman P, Aruldas MM y Arunakaran J (2005). Effect of Aroclor 1254 on Sertoli cellular antioxidant system, androgen binding protein and lactate in adult rat in vitro. *Toxicology* 212:195–205.
- Krutzsch PH (2000). Anatomy, physiology and cyclicity of the male reproductive tract. In: Crichton y Krutzsch, editors. Reproductive biology of bats. Academic Press, London, United Kingdom. Pp 91–155.
- Kukucka MA y Misra HP (1993). The antioxidant defense system of isolated guinea pig Leydig cells. *Mol Cell Biochem* 126:1–7.
- Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, Fukuda J, Kawamura K, Tanikawa H, Sato N y Tanaka T (2002). Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 8:118–123.
- Kumar GP, Seerwani N, Laloraya M, Nivsarkar M, Verma S y Singh A (1990). Superoxide dismutase as a regulatory switch in mammalian testicular steroidogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 302–308.

- Leclerc P, de Lamirande E y Gagnon C (1997). Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 22(4): 643–656.
- León-Galván MA (2008). Espermatogénesis en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, participación de la muerte celular por apoptosis. Tesis Doctoral, UAM-Iztapalapa, México.
- León-Galván MA, Fonseca T., López W.R., y Rosado A (1999). Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Can. J. Zool.* 77:7-12.
- León-Galván MA, López-Wilchis MA, Hernández OP, Arenas-Ríos E y Rosado A (2005). Male reproductive cycle of mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (chiroptera: vespertilionidae) *The southwestern naturalist* 50(4): 453-460.
- Lewis B y Aitken RJ (2001). Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biol Reprod* 64:1545–1556.
- Li S, Yan T, Yang JK, Oberley TD y Oberley LW (2000). The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 60:3927–3939.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG y Casper RF (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13:896–900.
- López WR (1989). Fisiología de *Plecotus mexicanus* (*Chiroptera vespertilidae*) en el estado de Tlaxcala. Tesis Doctoral UNAM, México.
- López-Diazguerrero NE, López-Araiza H, Juan HC, Conde-Perezprina H, Bucio L, Cárdenas-Aguayo C, Ventura LJ, Covarrubias L, Gutiérrez-Ruiza MC, Zentella A y

- Mina Königsberg (2005). Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence *Free Radical Biology & Medicine*
- López-Diazguerrero NE, Luna-López A, Gutiérrez-Ruiza MC, Zentella A y Mina Königsberg (2005). Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice. *Life Sciences* 77:2840–2854
- Lubicz-Nawrocki CM (1974). Effects of castration and testosterone replacement on the number of spermatozoa in the cauda epididymidis of hamsters. *J Reprod Fertil* 39:97–100.
- Luo L, Chen H, Trush MA, Show MD, Anway MD y Zirkin BR (2006). Aging and the brown Norway rat Leydig cell antioxidant defense system. *J Androl* 27:240–247.
- Macleod J (1943). The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 138:512–518
- Maiorino M, Wissing JB, Brigelius-Flohé R, Calabrese F, Roveri A, Steinert P, Ursini F y Flohé L (1998). Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPX by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J* 12(13):1359–1370.
- Maser RL, Magenheimer BS y Calvet JP (1994). Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* 269:27066–27073.
- Matsubara T y Ziff M (1986). Increased superoxide release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 137(10):3295–3298.
- McLachlan RI (2000). The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14:345–362.

- McLaren A (2000). Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol* 163: 3–9.
- Millar RP (1972). Degradation of spermatozoa in the epididymis of a seasonally breeding mammal, the rock hyrax, *Procavia capensis*. *J Reprod Fertil* 30: 447–450.
- Miura M, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T y Fujii I (2002). Apoptosis and expression of apoptosis related genes in mouse testis following heat exposure. *Fertil Steril* 77:787-793
- Moore HDM (1996). The influence of the epididymis on human and animal sperm maturation and storage. *Hum Reprod* 11:103–110.
- Mruk D, Cheng C, Cheng Y, Mo M, Grima J, Silvestrini B, Lee WM y Cheng CY (1998). Rat testicular extracellular superoxide dismutase: its purification, cellular distribution, and regulation. *Biol Reprod* 59:298–308.
- Nair R y Sahaha C (2003). Diethylstilbestrol induces rat spermatogenic cell apoptosis *in vivo* through increased expression of spermatogenic cell fas/fast system. *J Biol Chem* 278(8): 6470-6481
- Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M y Nakagawa Y (1999). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 274:29294–29302.
- Nonclercq D, Reverse D, Toubeau G, Beckers JF, Sulon J, Laurent G, Zanen J y Heuson-Stiennon JA (1996). In situ demonstration of germinal cells apoptosis during diethylbestrol-induced testis regression in adult male Syrian hamsters. *Biol Reprod* 55:1368-1376
- Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agrawal A, Larson K, Everson D, Thomas AJ Jr. y Alvarez JG (2001). Characterization of subsets of human

spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reprod* 16:1912-1921

Orth JM, Gunsalus GL y Lamperti AA (1988). Evidence from Sertoli celldepleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122: 787–794.

Peltola V, Huhtaniemi I y Ahotupa M (1992). Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl* 13: 450–455.

Peltola V, Huhtaniemi I, Metsa-Ketela y Ahotupa M (1996). Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 137: 105–112.

Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW y Behne D (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* 15(7): 1236–1238.

Plante M, De Lamirande E y Gagnon CA (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 62: 387–393.

Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Kontgen F, Adams JM y Cory S (1998). Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12424–12431.

Racey PA (1974). The reproductive cycle in male noctule bats, *Nyctalus noctula*. *Journal of Reproduction and Fertility* 41:169–181.

- Racey PA, y Entwistle (2000). Life-history and reproductive strategies of bats. In: Crichton y Krutzsch, editors. Reproductive biology of bats. Academic Press, London, United Kingdom. Pp 363–414.
- Racey PA y Tam HW (1974). Reproduction in male *Pipistrellus pipistrellus* (Mammalia: Chiroptera). *Journal of Zoology, London* 172:101–122.
- Raha S y Robinson BH (2000). Mitochondria, oxygen free radicals and ageing. *Trends Biochem Sci* 25:502-508
- Rejraji H, Vernet P y Drevet JR (2002). GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* 63:96–103
- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N y Breitbart H (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 70(2): 518–522.
- Robaire B, Barry T, Hinton y Marie-Claire Orgebin-Crist (2006). The epididymis. In: Knobil E, Neill J (eds.), the Physiology of Reproduction. St. Louis USA: Elsevier ©. Pp 1072–1148.
- Robinson R y Fritz IB (1981). Metabolism of glucose by sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 24: 1032–1041.
- Rousseaux J y Rousseaux-Prevost R (1995). Molecular localization of free thiols in human sperm chromatin. *Biol Reprod* 52:1066–1072.
- Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A y Ursini F (1992). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem* 267(9):6142–6146.
- Roveri A, Flohe´ L, Maiorino M y Ursini F (2002). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in sperm. *Methods Enzymol* 347:208–212.

- Roveri A, Ursini F, Flohe L y Maiorino M (2001). PHGPx and spermatogenesis. *Biofactors* 14:213–222.
- Rowley MJ, Teshima F y Heller CG (1970). Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil Steril* 21:390–396.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG y Bianchi U (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 4: 2801-2807.
- Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM y Aitken RJ (2003). Analysis of gene-specific DNA damage and single-strand DNA breaks induced by pro-oxidant treatment of human spermatozoa *in vitro*. *Mut Res* 529: 21–34.
- Schwaab V, Baud E, Ghyselinck N, Mattei MG, Dufaure JP y Drevet JR (1995). Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization. *Gene* 167:25–31.
- Segal AW y Abo A (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* 18,43–47.
- Seligman J y Shalgi R (1991). Protein thiols in spermatozoa and epididymal fluid of rats. *J Reprod Fertil* 93:399–408.
- Seligman J, Zipser Y y Kosower SN (2004). Tyrosine Phosphorylation, Thiol Status, and Protein Tyrosine Phosphatase in Rat Epididymal Spermatozoa *Biol Reprod* 71:1009–1015
- Shalgi R, Seligman J y Kosower NS (1989). Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol Reprod* 40:1037–1045.

- Shekarriz M, DeWire DM, Thomas AJ Jr. y Agarwal A (1995). A method of human semen centrifugation to minimize theiatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol* 28: 31–35.
- Shen HM y Ong CN (2000). Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Rad Biol Med* 28,529–536.
- Shitashige M, Morita I y Murota S (1998). Different substrate utilization between prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 in NIH3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1389:57–66.
- Shukla S, Jha RK, Laloraya M y Kumar PG (2005). Identification of nonmitochondrial NADPH oxidase and the spatio-temporal organization of its components in mouse spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 331:476-483
- Singh K y Krishna A (1995). Inhibitory effects of melatonin on testosterone but not on androstenedione production during winter in the vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *J Pineal Res* 19(3):127–132.
- Sinha-Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C y Swerdloff RS (2003). Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:175–182.
- Sinha-Hikim AP y Swerdloff RS (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4:38–47.
- Smith TT (1998). The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod* 58:1102–1104.
- Smithwick EB, Gould KG y Young LG (1996). Estimate of epididymal transit time in the chimpanzee. *Tissue Cell* 28:485–493.

- Sokal RR y Rohlf FJ (1995). *Biometry Edited by W.H. Freeman and Company*, New York.
- Sotolongo B y Ward WS (2000). DNA loop domain organisation: The three dimensional genomic code. *J Cell Biochem* (Suppl 35), 23–26.
- Stocco DM, Wells J y Clark BJ (1993). The effects of hydrogen peroxide on steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 133: 2827–2832.
- Storey BT (1997). Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3:203–213.
- Strbenc M, Fazarine G, Bavdek SV y Pogacnik A (2003). Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europeans L.*). *Anat Histol Embriol* 32(1):48-53.
- Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS y Aitken RJ (1995). Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in-vitro importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertil Steril* 63:1293–1300.
- Tash JS (1989). Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil Cytoskel* 14:332–339.
- Tash JS y Bracho GE (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *J Androl* 15:505–509.
- Thannickal y Fanburg LB (2000). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005–L1028
- Tilly JL y Tilly KI (1995). Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136:242–252.
- Tonks NK (2003). PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett* 546:140–148

- Tosic J y Walton A (1950). Metabolism of spermatozoa the formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and elimination of and effects on motility and survival. *Biochem J* 47:199–212.
- Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G, y Panfili E (1998). Antioxidant Systems in Rat Epididymal Spermatozoa. *Biol Reprod* 59:753-758
- Turner TT y Reich GW (1985). Cauda epididymal sperm motility: a comparison among five species. *Biol Reprod* 32:120–128.
- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(2): 335-344
- Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS y Aitken RJ (1998a). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: Lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 13:1429–1436.
- Twigg JP, Irvine DS y Aitken RJ (1998b). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13:1864–1871.
- Van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R y Jhoti H (2003). Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 423:773–777.
- Vernet P, Aitken RJ y Drevet JR (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 216:31-39
- Vernet P, Faure J, Dufaure JP y Drevet JR (1997). Tissue and developmental distribution dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5 a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev* 47:87–98.

- Vernet P, Fulton N, Wallace C y Aitken RJ (2001). Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa . *Biology of Reproduction* 65: 1102-1113.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Old-Clarke P y Kopf GS (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129–1137.
- Wang HP, Schafer FQ, Goswami PC, Oberley LW y Buettner GR (2003). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induces a delay in G1 of the cell cycle. *Free Radic Res* 37:621–630.
- Watson RW (2002). Redox regulation of neutrophil apoptosis. *Antioxid Redox Sign* 4(1): 97–104.
- Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MG y Ford WCL (1999). Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int J Androl* 22:236–242.
- Yanagimachi R (1994). Mammalian fertilization. In: Knobil K, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 189–317.
- Yang JQ, Buettner GR, Domann FE, Li Q, Engelhardt JF, Weydert CD y Oberley LW (2002). v-Ha-ras mitogenic signaling through superoxide and derived reactive oxygen species. *Mol Carcinog* 33:206–218.
- Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA y Parks DA (1990). Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 258: G564-570.

- Zini A, de Lamirande E y Gagnon C (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 16:183–188.
- Zini A y Schlegel PN (1997). Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. *Int J Androl* 20:86–91.
- Zipser Y, Piade A y Kosower NS (1997). Erythrocyte thiol status regulates band 3 phosphotyrosine level via oxidation/reduction of band 3-associated phosphotyrosine phosphatase. *FEBS Lett* 406:126–130.
- Zirkin BR y Chen H (2000). Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod* 63: 977–981.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

EDITH ARENAS RÍOS

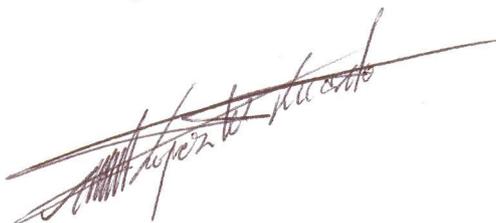
El día 29 de noviembre del año de 2009

Jurado:

Tutor: **Dr. Adolfo Rosado García**



Asesor: **Dr. Ricardo López Wilchis**



Asesor: **Dr. Efraín Mercado Pichardo**



Sinodal: **Dra. Gisela Fuentes Mascorro**



Sinodal: **Dr. Miguel Ángel León Galván**

