



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00084

Matricula: 2183801847

Caracterización de la
capacitación espermática en
el murciélago *Corynorhinus*
mexicanus

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 18 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. AHEIZER RODRIGUEZ TOBON
DRA. MA. DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ
MTRA. YOLOXOCHITL SANCHEZ GUEVARA
DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ



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

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: JOSE EDWIN MENDOZA SANCHEZ

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

Aprobar

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

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. AHEIZER RODRIGUEZ TOBON

VOCAL

DRA. MA. DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ

VOCAL

MTRA. YOLOXOCHITL SANCHEZ GUEVARA

SECRETARIA

DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe José Edwin Mendoza Sánchez, alumno (a) del posgrado Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Caracterización de la capacitación espermática en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*”,

Declaro que:

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 18 de noviembre del 20 20.

Atentamente

José Edwin Mendoza Sánchez

Nombre y firma del alumno

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

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

**“CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACITACIÓN
ESPERMÁTICA EN EL MURCIÉLAGO *Corynorhinus
mexicanus*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA:

BIÓL. EXP. JOSÉ EDWIN MENDOZA SÁNCHEZ

COMITÉ TUTORAL:

CODIRECTORES:

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

DR. JULIO CÉSAR CHÁVEZ ZAMORA

ASESOR

DR. AHIEZER RODRÍGUEZ TOBÓN

NOVIEMBRE, 2020

COMITÉ TUTORAL

Codirectora

Dra. Edith Arenas Ríos

Profesora-Investigadora. Titular "C" T.C.
Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide (Caseta 7B)
Área de Reproducción Animal Asistida
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
editharenas2000@yahoo.com.mx

Codirector

Dr. Julio César Chávez Zamora

Investigador Asociado "C" T.C.
Consorcio de Fisiología del Espermatozoide
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
julio.chavez@mail.ibt.unam.mx

Asesor

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Profesor-Investigador. Titular "C" T.C.
Laboratorio de Ecología y Biología de Mamíferos (AS-112)
Departamento de Biología
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
ahiezerrod@yahoo.com.mx

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Laboratorio de Ecología y Biología de Mamíferos
Departamento de Biología
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
ahiezerrod@yahoo.com.mx

Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Consortio de Fisiología del Espermatozoide
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
claudia.trevino@mail.ibt.unam.mx

Dra. Ma. Del Carmen Beltrán Núñez

Consortio de Fisiología del Espermatozoide
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
carmen.beltran@mail.ibt.unam.mx

M. C. Yoloxochitl Sánchez Guevara

Consortio de Fisiología del Espermatozoide
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
yoloxochitl.sanchez@mail.ibt.unam.mx

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro: 003797.

Para la realización de los estudios de maestría, el alumno **José Edwin Mendoza Sánchez** contó con el apoyo de la beca institucional de la Universidad Autónoma Metropolitana y la beca CONACYT mediante el número de registro CVU: 925549.

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “**Caracterización de la capacitación espermática en el murciélago *Corynorhinus mexicanus***” con fecha de examen 18 de noviembre de 2020.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 0006

Matrícula: 2183801647

Caracterización de la
capacitación espermática en
el murciélago *Corynorhinus
mexicanus*



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 18 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON
DRA. MA. DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ
MTRA. YOLOXOCHITL SANCHEZ GUEVARA
DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

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

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: JOSE EDWIN MENDOZA SANCHEZ

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

Aprobar

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

JOSE EDWIN MENDOZA SANCHEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

VOCAL

DRA. MA. DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ

VOCAL

MTRA. YOLOXOCHITL SANCHEZ GUEVARA

SECRETARIA

DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

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

DEDICATORIA

A mis padres, **Ivonne Sánchez y José Mendoza**, ustedes son una gran motivación para cumplir mis sueños y esta maestría es uno de ellos, gracias por su apoyo, confianza, impulso y amor durante esta etapa de mi vida.

A mis hermanos, **Jesús, Gerardo** y a mi sobrino **Ian Ariel**, por compartir conmigo uno más de mis logros y por todo su apoyo.

A **Miguel Beltrán**, por compartir esta etapa juntos, motivarme, impulsarme y apoyarme en todo momento, por ser parte de mi vida y darme tanto amor. Gracias por enseñarme a disfrutar más de la vida sin descuidar mi formación académica y sobre todo por crecer juntos en todo sentido. ¡Vamos por más!

Con todo mi amor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Dra. Edith Arenas Ríos**, quien me apoyó, orientó y compartió toda su experiencia para realizar este proyecto, por depositar en mí su confianza desde mis estudios en la licenciatura y hasta la fecha. Gracias por darme la oportunidad de ser su alumno y seguir aprendiendo de usted.

Al **Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón**, por su apoyo y valiosa participación en todo el proyecto. Agradezco mucho todo el tiempo que me brindó y el interés que mostró en el proyecto desde el inicio hasta el final.

Al **Dr. Julio César Chávez Zamora**, quién me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio y quien compartiera conmigo su conocimiento, por estar pendiente y apoyarme en todo lo que involucro mi estancia en el Instituto de Biotecnología y la maestría.

A mis compañeros de la maestría generación 18-O, en especial a **Andrea, Luisa y Adyeni**. Gracias por hacer esta etapa más amena y divertida, sobre todo por brindarme su amistad. Ocupan un lugar muy especial en mí.

A **Gihovani, Ixchel** y **Angie**, gracias por todos los buenos momentos que compartimos en clases, en seminarios y en el laboratorio, por compartir desde el día uno su conocimiento y amor por los murciélagos, gracias a ustedes, me divertí en la maestría, amigos. ¡Gracias por todo!

A los integrantes actuales y que se han graduado del laboratorio: **Blanca, Ernesto, Víctor, Lorena, Yolanda, Julio, Beda** y **Verónica**, por su apoyo y consejos.

A los miembros del jurado de mi examen, **Dra. Claudia Treviño, Dra. Carmen Beltrán** y **Mtra. Yoloxochitl Sánchez**, por los comentarios y críticas para la mejora de esta tesis.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESÚMEN	3
ABSTRACT	5
1. Introducción	6
1. 1 Maduración espermática epididimaria	6
1. 2 Capacitación espermática	8
1. 3 Transporte iónico en el espermatozoide	11
1. 4 Gradiente de Ca^{2+} e hiperactivación	13
1. 5 Regulación del potencial de membrana en la capacitación espermática	16
2. Antecedentes	18

2. 1 Adquisición del potencial de fecundación en los espermatozoides del murciélago estacional <i>Corynorhinus mexicanus</i>	18
3. Justificación	21
4. Pregunta de investigación	22
5. Hipótesis	22
6. Objetivo general	22
7. Objetivos específicos	22
8. Diseño experimental	23
9. Material y métodos	24
9. 1 Reactivos y soluciones	24
9. 2 Captura de los animales de estudio	24
9. 3 Obtención de epidídimos y espermatozoides	26
9. 4 Capacitación espermática	26
9. 5 Análisis de la $[Ca^{2+}]_i$ en la célula única	27
9. 6 Evaluación de la movilidad espermática	28
9. 7 Evaluación del potencial de membrana	28
9. 8 Registros electrofisiológicos de espermatozoides	30
9. 9 Análisis Estadístico	31
10. Resultados	32
10. 1 Peso de testículos y epidídimos	32
10. 2 Evaluación Espermática	32
10. 2. 1 Concentración de espermatozoides	33

10. 2. 2 Movilidad espermática total	34
10. 2. 3 Análisis de los patrones de movilidad espermática por CASA	35
10. 2. 4 Análisis de la movilidad hiperactivada por CASA	36
10. 3 Evaluación de indicadores bioquímicos en la capacitación espermática ...	38
10. 3. 1 Análisis de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única	38
10. 3. 2 Medidas del potencial de la membrana plasmática	44
10. 3. 3 Registros electrofisiológicos de espermatozoides	46
11. Discusión	47
12. Conclusiones	54
13. Bibliografía	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- [Ca²⁺]_i**: Concentración intracelular de calcio
- 2-AG**: 2-araquidonoilglicerol
- ABHD2**: Dominio α/β hidrolasa, proteína 2
- ACs**: Adenilato ciclasa soluble
- ALH**: Amplitud lateral de la cabeza
- AMPc**: Monofosfato de adenosina cíclico
- ATP**: Adenosina trifosfato
- BSA**: Albúmina sérica bovina
- BWW**: Medio Biggers, Whitten y Whittingham
- CAP**: Condición capacitante
- CASA**: Análisis Espermático Asistido por Computadora
- Ca_v**: Canales de calcio dependientes de voltaje
- CTC**: Clortetraciclina
- D.E**: Desviación estándar
- E.E**: Error estándar
- Em**: Potencial de membrana
- ENaC**: Canales epiteliales de Na⁺
- F**: Fluorescencia
- F_{max}**: Fluorescencia máxima
- F_{Min}**: Fluorescencia mínima
- HCO₃⁻**: Bicarbonato
- Hv1**: Canal de protones 1
- KO**: Knockout
- LIN**: Linearidad
- mL**: mililitro
- mM**: Milimolar
- mV**: Milivoltios
- NBC**: Cotransportador Na⁺/ HCO₃⁻
- NC**: Condición No capacitante

NH₄Cl: Cloruro de amonio

NHE: Intercambiador Na⁺/H⁺

nm: Nanómetro

P4: Progesterona

pH_i: Potencial de hidrógeno intracelular

PKA: Proteína cinasa A

RA: Reacción acrosomal

SEMARNAT: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales

STM: Segmento transmembranal

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

VCL: Velocidad curvilínea

ZP: Zona pelúcida

μL: Microlitro

μM: Micromolar

RESUMEN

En los mamíferos, los espermatozoides adquieren la habilidad para fertilizar al ovocito mediante el desarrollo de la capacitación espermática en el tracto reproductor femenino. La capacitación implica una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos, en donde se describe un reordenamiento de la membrana plasmática, la activación de la vía AMPc/PKA, cambios en la permeabilidad iónica alterando el potencial de la membrana, modificaciones postraduccionales (fosforilación) y cambios en el patrón de movilidad. Este proceso se ha estudiado *in vitro* en la mayoría de los mamíferos. Sin embargo, en especies que presentan asincronía entre las funciones reproductivas primarias de los machos (espermatogénesis) y la receptividad de la hembra (cópulas), la capacitación espermática presenta algunas particularidades distintivas, ya que en el caso particular del murciélago *Corynorhinus mexicanus* el tiempo de maduración de los espermatozoides es mayor y se encuentra relacionado con el tiempo de almacenamiento prolongado en la *cauda* del epidídimo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la capacitación durante el periodo de almacenamiento espermático, en *Corynorhinus mexicanus*, mediante la participación de indicadores bioquímicos como la $[Ca^{2+}]_i$, el potencial de membrana y la hiperactivación de los espermatozoides. Para la realización de este proyecto, se capturaron 9 machos adultos de septiembre a noviembre de 2019. Se analizó el flujo de Ca^{2+} , en célula única, el potencial de membrana por espectrofotometría de fluorescencia y la hiperactivación en CASA. Se encontró que una concentración de $0.3 \mu M$ de progesterona y la alcalinización (empleando NH_4Cl) producen un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides sometidos a capacitación *in vitro*, indicando la posible presencia del canal iónico CatSper en este murciélago. Nuestros resultados de movilidad indican que un pH alcalino (8.0) aumenta el porcentaje de hiperactivación en condiciones no capacitantes y capacitantes, en comparación con el pH 7.2. Dado que CatSper es un canal activado por alcalinización y que está involucrado en la movilidad hiperactivada en otras especies de mamíferos, el cambio de movilidad que observamos se puede atribuir a la actividad de CatSper. Además, encontramos que el potencial de la membrana en

reposo de los espermatozoides antes de la capacitación es de ~ -83 mV y ~ -123 mV en condiciones capacitantes. Esto sugiere que en esta especie de murciélago están conservados algunos mecanismos asociados a la capacitación, en este caso la hiperpolarización de la membrana plasmática.

ABSTRACT

In mammals, sperm acquire the ability to fertilize the oocyte by developing sperm capacitation in the female reproductive tract. The capacitation involves a series of physiological and biochemical changes, such as a rearrangement of the plasma membrane, the activation of the cAMP /PKA pathway, changes in ionic permeability altering the membrane potential, post-translational modifications (phosphorylation) and changes in the motility pattern. These processes have been studied *in vitro* in most mammals. However, in species that present a synchrony between the primary reproductive functions of the males (spermatogenesis) and the receptivity of the female (mating), sperm capacitation presents some distinctive peculiarities, since in the particular case of the bat *Corynorhinus mexicanus* the time of sperm maturation is greater and is related to prolonged storage time in the *cauda* of the epididymis. Therefore, the objective of this work was to characterize the capacitation during the sperm storage period, in *C. mexicanus*, through the participation of biochemical indicators such as $[Ca^{2+}]_i$, the membrane potential and the hyperactivation of the spermatozoa. For this project, we employed sperm from 9 adult males, captured from September to November 2019. The Ca^{2+} flux, was analyzed in single cell microscopy, the membrane potential by measurements were done by fluorescence spectrophotometry, and the hyperactivation in CASA. It was found that of $0.3 \mu\text{M}$ of progesterone and alkalization (using NH_4Cl) produces an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in sperm at some point during an *in vitro* capacitation, indicating the possible presence of the CatSper ion channel in this bat. Our motility results indicate that an alkaline pH (8.0) increases the percentage of hyperarousal in non-capacitive and capacitating conditions, compared to pH 7.2. Since CatSper is an alkalization-activated channel and is known to be involved in hyperactivated motility in other mammalian species, the observed change in motility can be attributed to CatSper activity. Furthermore, we found that the resting membrane potential of sperm is ~ -83 mV and ~ -123 mV under capacitating conditions. This suggests that some mechanisms associated with capacitation are conserved in the *C. mexicanus* bat, as the hyperpolarization of the plasma membrane.

1. Introducción

El espermatozoide es la célula sexual masculina que se produce y diferencia dentro de los túbulos seminíferos del testículo durante la espermatogénesis: proceso continuo o estacional en la vida reproductiva de los animales (Griswold, 2016). Este proceso se caracteriza por la proliferación de espermatogonias por mitosis; la división de espermatocitos, generando células haploides por meiosis y la diferenciación morfológica de espermátidas a espermatozoides. Finalmente, los espermatozoides se liberan de los túbulos seminíferos y viajan a través de los conductos eferentes para ingresar al túbulo epididimario (Eddy, 2006; Griswold, 2016; Robaire et al., 2006). Sin embargo, los espermatozoides que llegan al epidídimo no son capaces de fertilizar al ovocito, esta capacidad la adquieren durante el tránsito por este órgano y culmina en el tracto reproductor femenino, en donde se presenta una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos descritos como capacitación espermática (Jin y Yang, 2017).

1. 1 Maduración espermática epididimaria

Los espermatozoides que transitan a través del epidídimo, experimentan cambios fisiológicos y bioquímicos que les permiten adquirir la movilidad progresiva y llevar a cabo la capacitación y reacción acrosomal en el tracto reproductor de la hembra (Gervasi y Visconti, 2017; Sullivan y Mieusset, 2016). Se ha descrito que en los mamíferos, el tiempo que le lleva a los espermatozoides recorrer el epidídimo puede ser de 6 días en el humano y 10 días en el ratón (Gervasi y Visconti, 2017).

El epidídimo es un órgano altamente convoluto, dividido en cuatro regiones anatómicas principales de acuerdo a los diferentes tipos celulares que conforman el epitelio a lo largo del órgano: 1) segmento inicial (región que recibe a los espermatozoides); 2) *caput* y; 3) *corpus* (regiones en donde ocurre la maduración de los espermatozoides en la mayoría de los mamíferos) y; 4) *cauda* (región de almacenamiento de espermatozoides) (Gervasi y Visconti, 2017; Rodríguez-Tobón,

Los cambios descritos en la maduración de los espermatozoides durante su paso por la región cefálica y corporal del epidídimo implican modificaciones en el movimiento flagelar, aumento en la carga negativa de la membrana plasmática, cambios en el coeficiente de fosfolípidos-colesterol, remodelación de microdominios de membrana, cambios en las glucoproteínas y fosforilación en residuos de tirosina de proteínas. Adicionalmente, también ocurren cambios morfológicos en los espermatozoides como la migración de la gota citoplasmática (Hernández-Rodríguez, 2016; Rodríguez-Tobón, 2016). Todos estos cambios implican interacciones complejas entre las secreciones epididimarias y los gametos masculinos: modificaciones que son esenciales para la adquisición de la capacidad de fecundación de los espermatozoides (Figura 1) (Hernández-Rodríguez, 2016; Rodríguez-Tobón, 2016; Sullivan y Mieusset, 2016).

Una vez que los espermatozoides han completado su maduración en el epidídimo, se almacenan en la *cauda* hasta el momento de la eyaculación. Posteriormente, se depositarán a nivel de la vagina o útero de la hembra, dependiendo de la especie, en donde continuarán con el siguiente paso de su maduración (Gervasi y Visconti, 2017).

1. 2 Capacitación espermática

En los mamíferos, a diferencia de los vertebrados inferiores como peces y anfibios, los espermatozoides no tienen la capacidad de fecundar a los ovocitos inmediatamente después de ser inseminados. Para tal efecto, necesitan pasar en el tracto reproductor de la hembra un determinado periodo de tiempo: 6 horas en murciélago, rata y conejo (Cervantes et al., 2008; Jin y Yang, 2017; Zhou et al., 2008) 4 horas en jabalí, cerdo y humano (Jiménez et al., 2003; Ritagliati et al., 2018). En el tracto reproductor femenino los gametos experimentan cambios bioquímicos y fisiológicos, conocidos como capacitación espermática, proceso descrito por Chueh Chang y Colin Russel Austin en 1951 utilizando el conejo como modelo

(Austin, 1952; del Río et al., 2007; Jin y Yang, 2017). A pesar de que fisiológicamente el espermatozoide debe transitar por el tracto reproductor femenino, la capacitación puede llevarse a cabo en condiciones *in vitro* incubando a los espermatozoides en un medio que contiene HCO_3^- , Ca^{2+} , albúmina y glucosa, induciendo los cambios necesarios para la adquisición del potencial fertilizante (Yanagimachi y Chang, 1963).

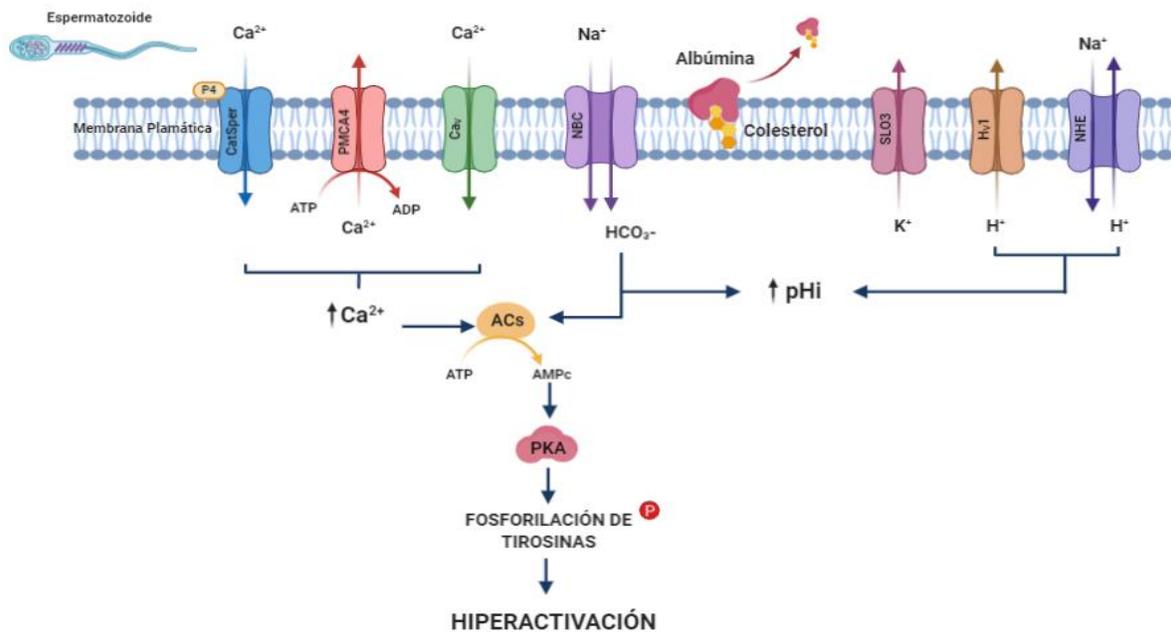


Figura 2. Representación esquemática de los cambios bioquímicos asociados a la capacitación espermática (humano-ratón). Los espermatozoides al ser depositados dentro del tracto reproductor femenino están expuestos a diversas moléculas, como la albúmina; encargada de eliminar el colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides. La activación del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) induce un incremento en los niveles de HCO_3^- , que en conjunto con la activación del canal de protones 1 (Hv1) en humano y el intercambiador Na^+/H^+ (sNHE) descrito en espermatozoides de ratón, incrementan el pHi . Por otro lado, hay un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; regulada por canales dependientes de voltaje (Ca_v) y por el canal CatSper. El aumento de Ca^{2+} y HCO_3^- , estimulan a la enzima adenilato ciclasa soluble (ACs) encargada de la síntesis de AMPc, logrando activar a la proteína cinasa A (PKA) desencadenando una cascada de fosforilación en proteínas con residuos de serina/treonina, lo que resulta en el patrón de movilidad hiperactivo de los espermatozoides. Modificado de: Freitas et al., 2017

Durante la capacitación, se presenta la remoción de colesterol de la membrana plasmática por albúmina, presente en el trato reproductor femenino, aumentando la fluidez de la membrana (Bailey, 2010; Gervasi y Visconti, 2016). Existe un aumento del potencial de hidrógeno intracelular (pH_i), importante en la movilidad hiperactivada y en la actividad de diversos canales iónicos que a su vez regulan las concentraciones iónicas intracelulares (Jin y Yang, 2017). Los intercambiadores de Na^+/H^+ (sNHE) específico de los espermatozoides y el canal de protones 1 (Hv1; dependiente de voltaje) son mecanismos de alcalinización intracelular en espermatozoides de ratón y humano, respectivamente. Además, en espermatozoides de ratón a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) hay un influjo de HCO_3^- que se asocia con el incremento del pH_i observado en la capacitación (Darszon et al., 2011; Demarco et al., 2003; Puga-Molina et al., 2018).

En humano los espermatozoides durante su tránsito a través del tracto reproductor femenino se encuentran en el medio extracelular una variación en el pH (6.5-8.0) (Ng et al., 2018), y diferentes concentraciones iónicas a las halladas en el epidídimo (Robaire et al., 2006; Ritagliati et al., 2018), es decir, la concentración externa de K^+ puede cambiar de 39 a 5–8 mM, la de Cl^- de 27 a 130 mM y la concentración externa de Na^+ de 38 a 140 mM en la cauda del epidídimo y oviducto, respectivamente (Miller et al., 2015). Por lo tanto, la permeabilidad de la membrana plasmática a iones Cl^- , HCO_3^- , Na^+ y K^+ , genera cambios en el potencial de membrana (E_m) que los espermatozoides deben regular, logrando la hiperpolarización durante la capacitación espermática (Ritagliati et al., 2018).

Otro cambio bioquímico que presentan los espermatozoides es un incremento en el ingreso de Ca^{2+} al citoplasma, asociado a la activación de canales e intercambiadores iónicos (Boerke et al., 2004; Darszon, 2007; Gervasi y Visconti, 2016). La concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es importante para la actividad de los espermatozoides dentro del tracto reproductor de la hembra, al regular la movilidad espermática, la hiperactivación y la reacción del acrosoma (RA) (Jin y Yang, 2017; Puga-Molina et al., 2018).

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y HCO_3^- estimulan la enzima Adenilato Ciclasa soluble (ACs) ADCY10 responsable de la síntesis de AMPc, activando la vía de señalización de la proteína cinasa A1 (PKA1). La PKA1 por su parte, fosforila algunas proteínas en los residuos de serina/treonina, desencadenando adicionalmente la fosforilación en residuos de tirosinas (Figura 2) (Gervasi y Visconti, 2016; Jin y Yang, 2017). En conjunto, esta serie de cambios en los espermatozoides durante la capacitación, se caracterizan por la hiperactivación de los gametos (patrón asimétrico de movilidad en los espermatozoides, es decir, fuerte batido flagelar asimétrico de alta amplitud y frecuencia baja), proceso que se requiere para liberar a los espermatozoides unidos al epitelio oviductal, además, de favorecer la capacidad de llevar a cabo la RA (Gervasi y Visconti, 2016; Stival *et al.*, 2016). La RA es un evento exocitótico dependiente de Ca^{2+} , que se creía se desencadenaba por la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida del ovocito. Sin embargo, ahora se sabe que los espermatozoides sufren la RA por estímulo de moléculas sintetizadas por las células del cúmulus (como la progesterona) antes de llegar a la zona pelúcida (ZP) (Hirohashi *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2011; Okabe, 2016). Durante la RA la membrana externa del acrosoma se fusiona en múltiples puntos con la membrana plasmática, liberando las moléculas presentes en el interior del acrosoma que le ayudan al espermatozoide a romper las uniones entre las células del cúmulus y poder llegar a la ZP (Okabe, 2016; Stival *et al.*, 2016).

1. 3 Transporte iónico en el espermatozoide

En las células, los flujos iónicos a través de la membrana plasmática se regula por proteínas transportadoras (canales y transportadores iónicos) (Kulbacka *et al.*, 2017; Shukla, Mahdi, y Rajender, 2012); los iones fluyen por transporte pasivo (difusión facilitada), a favor de un gradiente electroquímico (combinación del gradiente de concentración con el potencial eléctrico) indicando la dirección de su transporte, es

decir, se mueven desde donde se encuentra más concentración hacia donde están más diluidos y desde donde tienen mayor potencial eléctrico hacia donde tienen menor potencial eléctrico. Sin embargo, existe un sistema de transporte activo que requiere de energía metabólica (ATP) para el transporte de iones. El transporte activo permite el movimiento de solutos contra un gradiente de concentración (de baja a alta concentración). Existen dos tipos de transporte activo: transporte directo (gasto de ATP) y transporte indirecto o cotransporte que implica el flujo de dos moléculas distintas (simporte, en la misma dirección; antiporte, en direcciones opuestas) (Kulbacka et al., 2017).

Por otra parte, el transporte pasivo comprende el movimiento de moléculas a favor del gradiente de concentración (de una mayor a menor concentración); por lo tanto, no requiere energía. Dentro de los tipos de transporte pasivo, la difusión facilitada permite el flujo de moléculas a través de proteínas transportadoras y canales iónicos (Kulbacka et al., 2017).

Los canales iónicos poseen un poro hidrofílico que permite el flujo de iones (Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+}) a favor de gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática, y en general poseen una alta selectividad y eficiencia en el paso de los iones (Shukla et al., 2012). Bajo estimulación, cambian su conformación para permitir su activación (apertura y cierre) (Kulbacka et al., 2017; Shukla et al., 2012). Dependiendo del tipo de canal iónico pueden activarse en respuesta a: cambios de voltaje o potencial de membrana, alcalinización, unión de ligandos (hormonas, neurotransmisores e iones) y fuerzas mecánicas (Kulbacka et al., 2017).

En el espermatozoide, la función de los canales iónicos se asocia a la capacitación y la RA (Shi et al., 2003). Sin embargo, los espermatozoides se consideran transcripcionalmente silenciosos. Esto significa que, los canales iónicos que encontramos en los gametos masculinos se sintetizan desde que son células espermatogénicas (Darszon et al., 2011). Además, durante el tránsito por el epidídimo, los espermatozoides experimentan cambios en su contenido de

proteínas, que se cree son sintetizadas por el epitelio epididimario (Cuasnicú et al., 2002) e incorporadas a los espermatozoides mediante vesículas conocidas como epididimosomas (Sullivan y Saez, 2013). Esto incluye proteínas de membrana como canales iónicos y de reconocimiento con el ovocito (Gervasi y Visconti, 2017).

El flujo de iones durante la capacitación espermática modula el pH_i , Em y $[Ca^{2+}]_i$ de importancia para la fecundación de los espermatozoides (Puga-Molina et al., 2018).

1. 4 Gradiente de Ca^{2+} e hiperactivación

El Ca^{2+} es un ion y segundo mensajero de importancia para la activación de la vía de señalización que incluye AMPc, la movilidad del espermatozoide al regular el deslizamiento de los microtúbulos impulsados por dineína (proteína motora que impulsa al flagelo), la hiperactivación y la RA (Jin y Yang, 2017; Puga-Molina et al., 2018). A bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular, el flagelo bate simétricamente. Cuando los niveles de Ca^{2+} aumentan, la onda de batido es asimétrica, hiperactivando al espermatozoide. Este patrón de movilidad es esencial para que el espermatozoide pueda llegar al sitio de fecundación con el ovocito (Figura 3). Sin embargo, altos niveles de Ca^{2+} ($\sim 9\mu M$) suprimen la movilidad, atribuida a la disminución en la fosforilación de proteínas (Pereira et al., 2017).

Existen dos maneras por las cuales la $[Ca^{2+}]_i$ incrementa: 1) por las pozas internas (orgánulos que pueden almacenar y liberar Ca^{2+} , como el acrosoma) y 2) a través de canales y transportadores iónicos (bombas dependientes de ATP) en la membrana plasmática que importan y exportan iones Ca^{2+} , respectivamente, regulando su concentración intracelular (Jin y Yang, 2017).

Específicamente en los espermatozoides se encuentra un canal de Ca^{2+} (CatSper), localizado en la membrana de la pieza principal del flagelo. CatSper es uno de los reguladores de la $[Ca^{2+}]_i$, esencial para la movilidad hiperactivada del espermatozoide y por lo tanto la fertilidad masculina (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). El canal CatSper se conserva evolutivamente en el genoma,

distribuyéndose amplia pero heterogéneamente en todos los linajes de eucariotas, desde mamíferos y réptiles hasta invertebrados como equinodermos, cnidarios y ctenóforos. Sin embargo, los genes de CatSper se pierden en teleósteos, anfibios y aves (Cai y Clapham, 2008; Cai et al., 2014; Romero y Nishigaki, 2019).

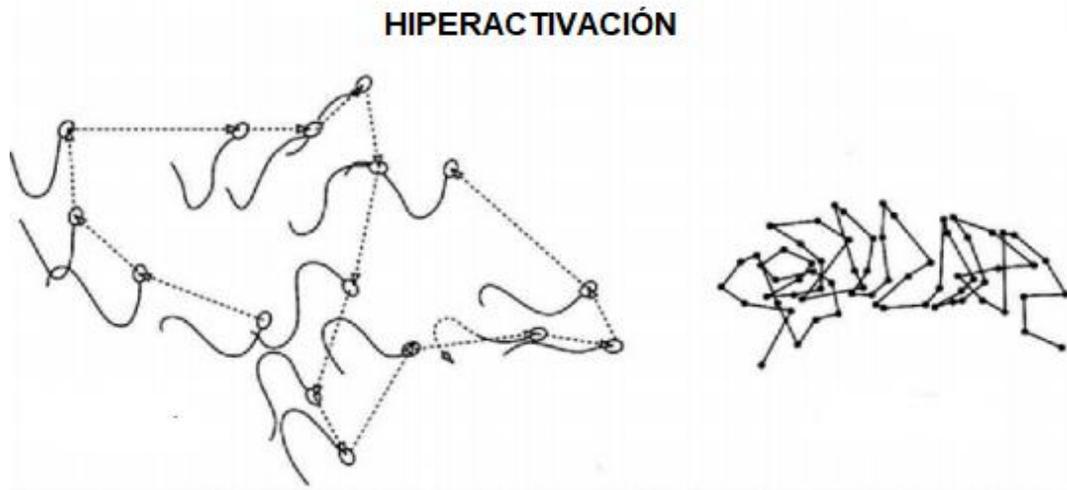


Figura 3. Trayectoria de movilidad hiperactivada en espermatozoides de humano. El movimiento de los espermatozoides muestra un aumento en la amplitud de la curvatura flagelar y una asimetría en su patrón de batido. Modificado de: Vallvè, 2017.

CatSper se activa por voltaje, alcalinización y diversos ligandos como la progesterona (P4), dependiendo de la especie. Este canal se compone de diez subunidades: cuatro subunidades α formadoras de poro (CatSper 1-4) así como cinco subunidades auxiliares: CatSper β (beta), CatSper γ (gamma), CatSper δ (delta), CatSper ζ (zeta) y CatSper ϵ (épsilon) y EFCAB9 (proteína similar a la calmodulina, actúa como un sensor dual de Ca^{2+} y pH) (Chung et al., 2017; A Darszon et al., 2011; Rahban y Nef, 2020). Cada subunidad α tiene seis segmentos transmembranales (STM); los primeros cuatro STM contienen el sensor de voltaje y los dos últimos forman el poro del canal (Singh y Rajender, 2015). En la región del poro se encuentran repetidos cuatro residuos de glutamina/aspartato que

proporcionan la selectividad a Ca^{2+} en el canal (Singh y Rajender, 2015; Navarro et al., 2008). Los aminoácidos cargados positivamente (lisina/arginina) están presentes en la región transmembranal S4 para detectar el voltaje y activar el canal. CatSper1 difiere de CatSper (2-4) por presentar un dominio rico en residuos de histidina en el N-terminal, el cual funciona como un sensor del pH_i (alcalinización) (Darszon et al., 2011).

Estudios sobre CatSper concluyen que la ausencia de este canal iónico o deficiencia de cualquier subunidad afecta la fertilidad masculina, impidiendo que el espermatozoide llegue a la zona de reconocimiento con el ovocito y lo fecunde (Pereira et al., 2017).

De acuerdo con Orta et al. (2018), la alcalinización dependiente de NH_4Cl provoca una elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por la activación de CatSper. Se ha reportado que el NH_4Cl , induce el aumento de Ca^{2+} sin desencadenar la liberación de Ca^{2+} de almacenes internos y la reacción del acrosoma en espermatozoides de ratón y humano, por lo que esta base débil se emplea durante la capacitación espermática (Chávez *et al.*, 2018).

Además, se ha encontrado que CatSper puede ser estimulado por hormonas esteroides (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). Una de las hormonas más estudiadas es la P4, que se sintetiza y libera por las células de la granulosa del folículo (Brown et al., 2017). Se ha demostrado que la P4 induce el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los espermatozoides de ratón (Romarowski et al., 2016) y humano (Brown et al., 2017), desencadenando respuestas fisiológicas como la movilidad hiperactivada (Achikanu et al., 2018). Lishko et al. (2011), determinaron por patch-clamp que P4 y el aumento del pH_i activan al canal CatSper en espermatozoides de humano aumentando el influjo de Ca^{2+} .

Los espermatozoides se depositan en el tracto reproductor femenino y se exponen a la P4 y a diversas moléculas antes de que entre en contacto con el ovocito, en donde concentraciones nanomolares de P4 pueden activar el canal (Lishko et al., 2011). Esta activación podría tener lugar por la unión directa de P4 a CatSper, o se

ha sugerido la unión de P4 a una serina hidrolasa ABHD2 (dominio α/β hidrolasa, proteína 2; 425 aminoácidos). En la membrana plasmática del espermatozoide se produce constantemente un endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) para mantener cerrado-inhibido a CatSper; la unión de P4 con ABHD2 se propone provoca la degradación de 2-AG, activando al canal, permitiendo el flujo de Ca^{2+} al interior del espermatozoide (Miller et al., 2016).

Por otro lado, se han observado canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) en los espermatozoides de algunas especies que participan en la regulación de la concentración intracelular de este ion. Los canales Ca_v , se regulan por cambios en el Em, catalogándose en varias clases funcionales, activados por alto voltaje (HVA) o tipo L (se necesita de despolarizaciones altas en el Em para abrir los canales) y canales activados por bajo voltaje (LVA) o tipo T (se abren transitoriamente por despolarizaciones bajas) (Darszon et al., 2006; Darszon et al., 2011). Responden (apertura y cierre) a los cambios en el flujo y gradiente de iones generando como resultado un potencial eléctrico (Ritagliati et al., 2018).

Además, las proteínas G activadas a través de diferentes vías, incluidas las activadas por neurotransmisores y hormonas, regulan de forma directa los canales Ca_v , a través de interacciones físicas entre la proteína G y las subunidades del canal o indirectamente a través de segundos mensajeros y/o por proteínas cinasas (Darszon et al., 2011). Los canales Ca_v están distribuidos de manera heterogénea a lo largo del flagelo, por lo que es posible que participen en la movilidad de los espermatozoides (Darszon et al., 2011). Sin embargo, la caracterización de los canales Ca_v en espermatozoides por electrofisiológica ha sido difícil de estudiar.

1. 5 Regulación del potencial de membrana en la capacitación espermática

En los espermatozoides, el flujo, el gradiente y la permeabilidad de iones genera como resultado un potencial eléctrico, conocido como Em (Ritagliati *et al.*, 2018). La función de la hiperpolarización del Em se atribuye a la activación de canales dependientes de voltaje en el espermatozoide que permitirán la exocitosis del

contenido acrosomal para la fertilización (Darszon et al, 2006; López-González et al., 2014; Treviño et al., 2004).

Los cambios en el Em durante la capacitación en espermatozoides de ratón son en promedio de -40 mV a -80 mV (De La Vega-Beltran et al., 2012), que se sugieren por dos mecanismos: 1) la disminución de la actividad de los canales epiteliales de Na⁺ (ENaC); y 2) la apertura de un canal de K⁺ (SLO3) activado por el incremento del pH_i durante este proceso (López-González et al., 2014).

Los ENaC están formados por cuatro subunidades: α, β, γ y δ, donde α y δ forman el poro del canal. Estos canales pueden estar regulados por pH, Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻ y fosforilación (Ritagliati et al., 2018). Se expresan en muchos tipos de células, y las subunidades α y δ están presentes en espermatozoides de ratón y humano, distribuidos en la pieza media de estas células. Hernández-González et al. (2006), demostraron que la permeabilidad de Na⁺ se involucra en el Em de reposo de los espermatozoides y que esta permeabilidad se disminuye durante la capacitación. Por lo tanto, la disminución en Na⁺ se atribuye a la regulación negativa de ENaC, lo que resulta en hiperpolarización del Em plasmática (Escoffier et al., 2012).

Por medio de un análisis filogenético, se determinó que los canales SLO3 están presentes en aves, reptiles, peces y mamíferos (Vicens et al., 2017). En mamíferos como el humano y el ratón los canales SLO3 se localizan en la pieza principal del flagelo y se activan mediante alcalinización intracelular y despolarización de la membrana (Chávez et al., 2013; Puga-Molina et al., 2020; Santi et al., 2010). Estos canales poseen siete hélices transmembrana S0 – S6; el poro selectivo de K⁺ está formado por S5 y S6 que permite la salida de este ion. Santi et al. (2010), demostraron que SLO3 es responsable de la hiperpolarización en espermatozoides de ratón, aumentando la permeabilidad de K⁺ durante la capacitación *in vitro* en el modelo de ratón nulo (KO) para SLO3. Además, Chávez et al. (2013), indican que la ausencia del canal SLO3 disminuye el flujo de Ca²⁺ en el flagelo, afectando la movilidad espermática y la fecundación del ovocito. Por lo tanto, la participación de

SLO3 en la fisiología del espermatozoide es esencial para la fertilidad masculina (Chávez et al., 2013; Santi et al., 2010).

2. Antecedentes

2. 1 Adquisición del potencial de fecundación en los espermatozoides del murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*

Dentro de los modelos animales en los que se ha estudiado la capacitación, se incluye al murciélago *Corynorhinus mexicanus* (Cervantes et al., 2008; Rodríguez-Tobón et al., 2016). Sin embargo, en esta especie de murciélago (sin secuenciación de su genoma) no se han caracterizado los cambios fisiológicos y bioquímicos que presenta el espermatozoide durante la capacitación. *Corynorhinus mexicanus* es un murciélago insectívoro de zonas templadas, endémico de México, de la familia Vespertilionidae. Presenta un patrón reproductivo monoéstrico estacional. El macho presenta una asincronía temporal en sus funciones reproductivas (desarrollo y función de los órganos reproductores). Es decir, la espermatogénesis ocurre en verano, mientras que el máximo desarrollo de los epidídimos, glándulas sexuales accesorias, el cortejo y el apareamiento ocurren en otoño (León-Galván, 2005), periodo en que las hembras se encontrarán receptivas a los machos (Figura 4) (León-Galván et al., 1999; León-Galván et al., 2005).

Una de las estrategias reproductivas de este murciélago vespertiliónido es el almacenamiento prolongado de los espermatozoides tanto en la hembra (aproximadamente tres meses) en el útero, vagina u oviducto, como en el macho (aproximadamente de cinco meses) en la región caudal del epidídimo, que permite a los machos sincronizarse con el arribo de hembras receptivas derivado de la asincronía en su patrón reproductivo, permitiendo el éxito en los apareamientos y asegurando la fecundación (León-Galván et al., 1999; León-Galván et al., 2005). El almacenamiento prolongado se caracteriza por iniciar en el mes de septiembre y

terminar a finales del mes de enero, aunque los apareamientos en esta especie suceden principalmente en noviembre (Rodríguez-Tobón et al., 2016; Rodríguez-Tobón et al., 2011). Se ha demostrado que los espermatozoides permanecen íntegros estructural y funcionalmente e incrementa el porcentaje de células que se capacitan en relación con el tiempo de almacenamiento (Rodríguez-Tobón, 2016).

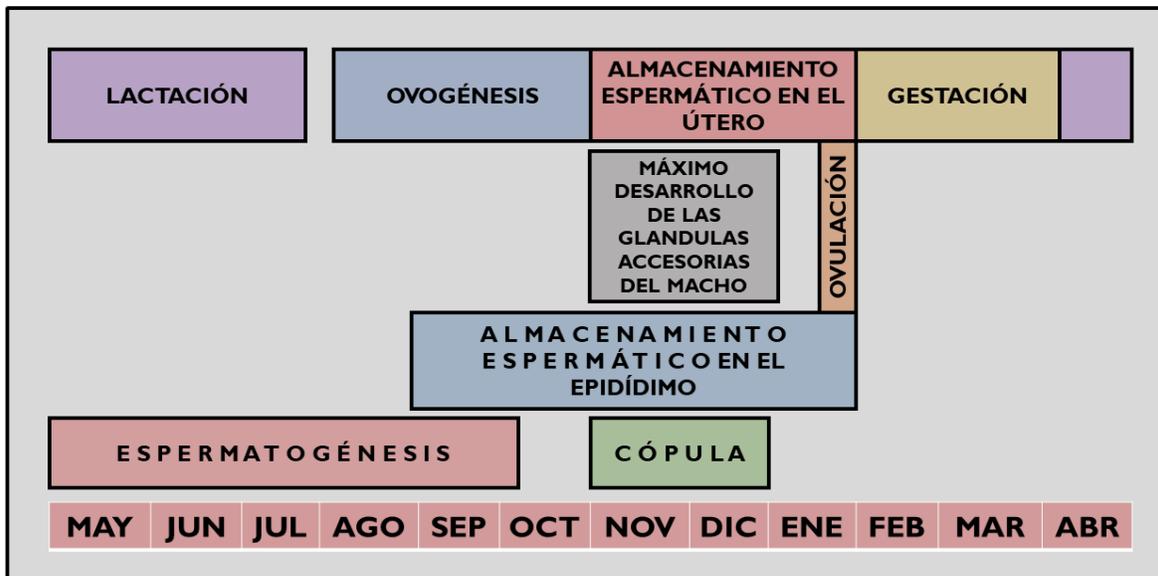


Figura 4. Esquema del patrón reproductivo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Se representan los eventos fisiológicos del macho y la hembra durante un ciclo reproductivo anual. Las hembras son monoéstricas estacionales; la ovogénesis se presenta durante los meses de agosto-octubre y las cópulas en noviembre y diciembre. Dentro de las estrategias reproductivas de este murciélago se encuentra capacidad de almacenar los espermatozoides durante periodos prolongados, tanto en la hembra (noviembre-enero) como en el macho (septiembre-enero). En este último, la espermatogénesis ocurre en los meses de mayo-septiembre, además, del máximo desarrollo de las glándulas accesorias en noviembre y diciembre. Modificado de: Rodríguez-Tobón et al., 2010.

Cervantes et al. (2008), analizaron la capacitación *in vitro* de espermatozoides de las tres regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) de *Corynorhinus mexicanus*, determinando que: el porcentaje de espermatozoides capacitados *in vitro* es dependiente del tránsito de los espermatozoides por el epidídimo y aumenta dependiendo del tiempo de almacenamiento en la *cauda* epididimaria. Es decir, al inicio de septiembre se reporta por microscopia de fluorescencia con clortetraciclina

(CTC) 6% de espermatozoides capacitados en la región del *cuerpo* del epidídimo y 16% en el caso de la *cauda*, valores que aumentaron en octubre (mes correspondiente al almacenamiento de espermatozoides) a 19.4% y 33.2% respectivamente.

Rodríguez-Tobón et al. (2016), demuestran que los espermatozoides de la región caudal del epidídimo capacitados *in vitro* durante la primera mitad del período de almacenamiento (11 de septiembre) muestran un porcentaje bajo de capacitación (15%), aumentando 40% en la segunda mitad del periodo de almacenamiento (22 de octubre), lo que sugiere que la capacitación es dependiente del tiempo de almacenamiento espermático en el epidídimo. Sin embargo, al analizar el número de espermatozoides epididimarios que presentan fosforilación en residuos de tirosina (indicador de la capacitación espermática), se encontró que el mayor nivel de fosforilación en proteínas fue en los espermatozoides obtenidos de la región caudal a finales de septiembre, en comparación con los del mes de octubre, lo que indica la activación de proteínas encontradas en el flagelo de los espermatozoides que participan en la adquisición de la movilidad progresiva.

Por otro lado, Álvarez-Guerrero et al. (2016), estudiaron en espermatozoides del murciélago *Artibeus jamaicensis* de la familia Phyllostomidae, la capacitación y RA en condiciones *in vitro* a 32 y 37 °C con y sin P4 a diferentes horas (0-8 horas). Encontraron a través de diferentes patrones de fluorescencia con clortetraclina que la capacitación inicia a las 4 horas de incubación, alcanzando el mayor porcentaje a las 6 horas. Además, se observó con base a la integridad del acrosoma, que el porcentaje de espermatozoides implicados en la RA aumentó a medida que pasaba el tiempo de incubación, alcanzando valores del 50%. No encontraron diferencias significativas entre las temperaturas, pero si un aumento significativo con la presencia P4 en la capacitación y RA. Por lo tanto, sugieren que en los espermatozoides de *A. jamaicensis*, tanto la capacitación como la RA, no dependen de la temperatura, sino de factores presentes en el tracto reproductor de la hembra.

Sin embargo, someter a los espermatozoides a diferentes temperaturas (32 y 37 °C) afectó la movilidad de los espermatozoides conforme pasó el tiempo de incubación.

3. Justificación

Los espermatozoides en mamíferos encuentran y fertilizan al ovocito una vez eyaculados e inseminados en el tracto reproductor de la hembra. Sin embargo, en *Corynorhinus mexicanus* los espermatozoides se almacenan por 5 meses en el epidídimo y posteriormente 3 meses en el aparato reproductor de la hembra, como consecuencia de su patrón reproductivo (estacional asincrónico). Por lo que, los mecanismos moleculares que facilitan que los espermatozoides se capaciten pueden ser diversos, especialmente los canales iónicos pueden estar actuando de una manera diferente en esta especie, respecto a otros mamíferos (Miller et al., 2015).

La capacitación de los espermatozoides en mamíferos está regulada por cambios bioquímicos como el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, la movilidad hiperactivada y la hiperpolarización de la membrana plasmática, que a su vez está regulada por la homeostasis iónica, generando el potencial fertilizante de los espermatozoides (Ritagliati et al., 2018).

Aunque la capacitación se describió por primera vez en 1951, el proceso aun no es comprendido completamente. Estudios recientes en espermatozoides de diferentes especies indican diferencias entre roedores, humanos y rumiantes en la regulación de iones durante la capacitación. Rodríguez-Tobón et al. (2016), describen que en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* a diferencia de otros mamíferos, la maduración espermática epididimaria termina en la región caudal del epidídimo. Se encontró que sólo el 15% de los espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo logran capacitarse y el 12% presentan reacción acrosomal espontánea al comienzo del período de almacenamiento e incrementa después de que los espermatozoides se almacenan durante 6 semanas en el túbulo epididimario. Sin embargo, aún se desconocen qué cambios bioquímicos y fisiológicos se asocian a

la capacitación espermática, como la regulación de Ca^{2+} intracelular, la movilidad hiperactivada y los cambios en el Em.

Por lo tanto, el conocimiento de la vía de capacitación y los cambios bioquímicos en los espermatozoides podría mejorar nuestra comprensión de los eventos relacionados con el estado fisiológico de los espermatozoides en un modelo con almacenamiento espermático prolongado, así como asincrónico entre las funciones reproductivas, como el murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

4. Pregunta de investigación

¿Las modificaciones en el flujo de Ca^{2+} , el Em y la movilidad de los espermatozoides, así como la activación de canales iónicos de Ca^{2+} por alcalinización y/o factores como P4, se pueden considerar indicadores de la capacitación espermática en *Corynorhinus mexicanus*?

5. Hipótesis

Si los espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus* presentan modificaciones como el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cambios en el patrón de movilidad y en el Em por alteraciones bioquímicas, entonces serán indicadores de que ocurrió la capacitación espermática en esta especie de murciélago.

6. Objetivo general

Caracterizar la capacitación espermática *in vitro* del murciélago *Corynorhinus mexicanus* por indicadores bioquímicos.

7. Objetivos específicos

- Determinar si el Ca^{2+} intracelular se modifica por la estimulación de los espermatozoides con P4 y NH_4Cl en la capacitación espermática.
- Determinar si la movilidad espermática se modifica alterando el pH en espermatozoides del murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

- Determinar si el potencial de membrana se modifica en el proceso de capacitación espermática *in vitro* en espermatozoides del murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

8. Diseño Experimental

Para cumplir con los objetivos de este trabajo, se evaluaron en murciélagos machos de *Corynorhinus mexicanus*: la calidad espermática, el Em plasmática, la movilidad hiperactivada y la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 5).

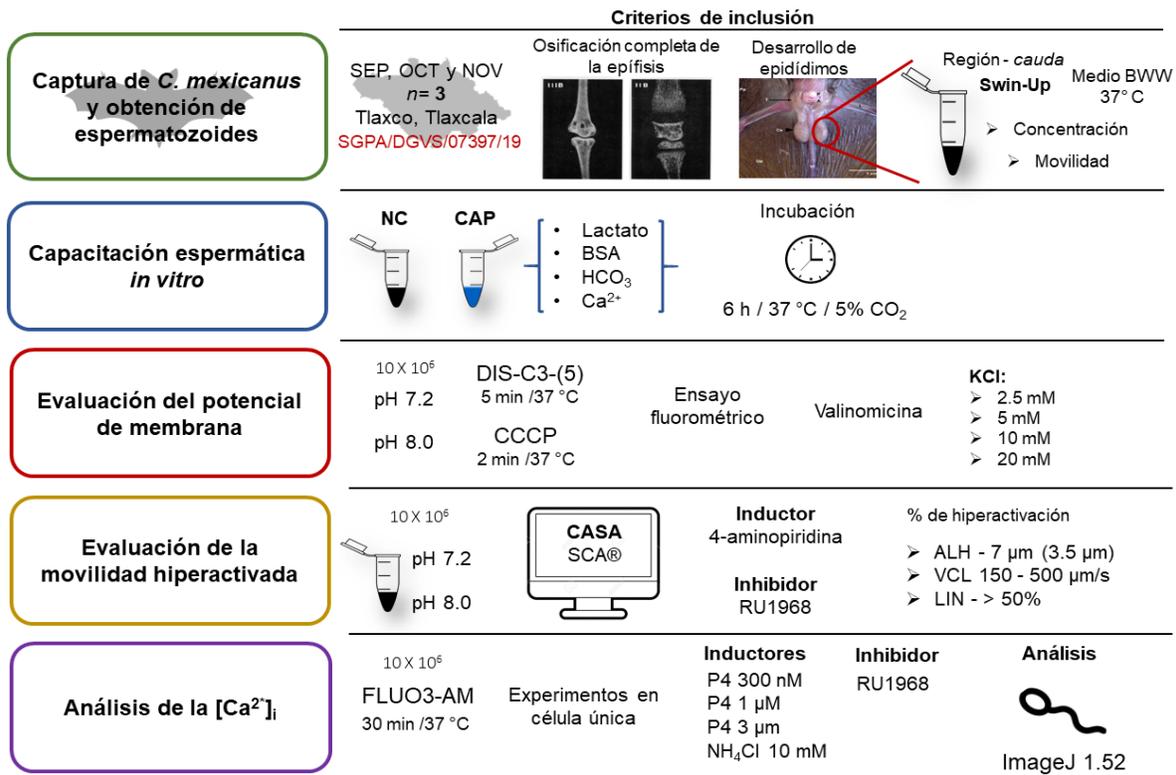


Figura 5. Representación esquemática de las pruebas realizadas en espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus*.

9. Materiales y métodos

9. 1 Reactivos y soluciones

Medio Biggers, Whitten, and Whittingham (BWW; Biggers et al., 1971) (En mM: 95 NaCl, 5 KCl, 1.7 CaCl₂, 1.1 KH₂PO₄, 1.19 MgSO₄ – 7H₂O, 25.07 NaHCO₃, 10 HEPES y 5.56 D-Glucosa), BWW-Suplementado (En mM: 1.19 Piruvato de Na⁺, 21.58 Lactato de Na⁺ y 0.1% w/v BSA). Solución fisiológica HS (En mM: 135 NaCl, 5 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgSO₄, 10 ácido láctico, 1 Na-piruvato, 5 glucosa, 20 HEPES). Solución DVF (en mM: gluconato de sodio 150, 2 Na, 2 HEDTA, 2 EGTA, 20 HEPES).

Los siguientes reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO): valinomicina, cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP), ionomicina, cloruro de amonio (NH₄Cl) y progesterona. El yoduro de 3, 3'-dipropiltiadicarbocianina (DiSC3- (5)), se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA) y el Fluo-3 acetoxymethyl (AM) éster (Fluo-3-AM) de Life Technologies Corporation (Invitrogen).

9. 2 Captura de los animales de estudio

El murciélago *Corynorhinus mexicanus* no se encuentra incluido en ninguna categoría de animales amenazados según la NOM-059-SEMARNAT-2010. Los ejemplares utilizados en el estudio se colectaron bajo el permiso SGPA/DGVS/07397/19 otorgado al Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón por la Dirección General de Vida Silvestre, dependencia de la SEMARNAT.

Los ejemplares se capturaron durante el día con redes de golpe en el interior del refugio “El Túnel” ubicado a 19°37'14" N, 98°02'02" O, en el municipio de Tlaxco, Tlaxcala, México (Figura 6).

Las capturas se realizaron mensualmente durante la etapa del ciclo reproductivo en que los espermatozoides se almacenan en la *cauda* del epidídimo de este murciélago (septiembre-noviembre).

Los individuos se seleccionaron bajo el criterio del completo cierre de las epífisis metacarpo-falange del cuarto dedo de la mano (Kunz y Anthony, 1982) y características macroscópicas del epidídimo, el cual es escrotal, alargado, con apariencia bulbosa y tono blanquecino, indicativo de madurez sexual en los ejemplares (Figura 7) (León-Galván *et al.*, 2005; Rodríguez-Tobón, 2016). Los murciélagos se transportaron de manera individual vivos en costales de manta, al laboratorio del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular en el Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, Morelos.



Figura 6. Fotografías del refugio “El túnel” de *Corynorhinus mexicanus* en el Ejido “La Calpaneria” en la sierra de Tlaxco, Tlaxcala, México.

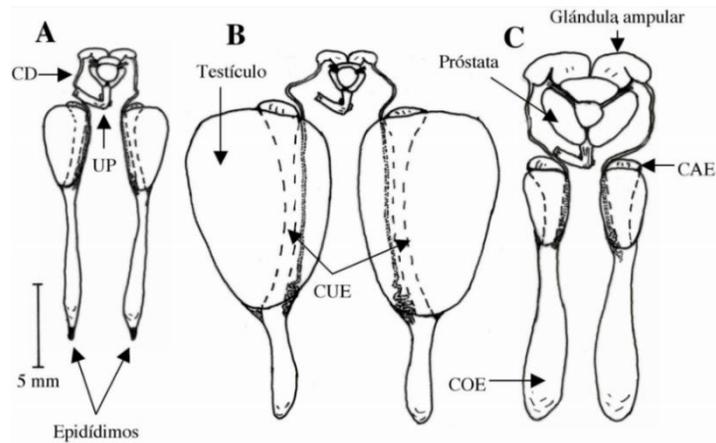


Figura 7. Cambios macroscópicos de los órganos reproductores del murciélago *Corynorhinus mexicanus* durante un ciclo anual. A) Condición reproductiva inactiva; B) Desarrollo de la espermatogénesis (máximo crecimiento testicular); C) Almacenamiento de espermatozoides en la región de la cola epididimaria y máximo desarrollo en longitud de los epidídimos. CD= Conducto deferente, CAE= cabeza, CUE= cuerpo y COE= cola del epidídimo. Tomado de: Rodríguez-Tobón et al., 2010.

9. 3 Obtención de epidídimos y espermatozoides

Los ejemplares se sacrificaron por decapitación e inmediatamente después se realizó una incisión de la piel interfemorales y la túnica vaginal que la cubre; los epidídimos y testículos (izquierdo-derecho) se extrajeron y pesaron. Únicamente se utilizó la región caudal del epidídimo. A este tejido se le realizaron cortes con tijeras de disección y se depositó en un tubo eppendorf con 1 mL de medio BWW a 37°C, pH 7.2. Los espermatozoides móviles se obtuvieron utilizando la técnica de Swim-up, manteniéndolos 15 minutos en incubación a 37 °C (León-Galván et al., 2005; Rodríguez-Tobón, 2016). La movilidad y concentración espermática se determinó mediante una cámara de conteo Makler, en la que se adicionó una alícuota de 10 µL de la muestra de espermatozoides para el conteo y registro de espermatozoides móviles (WHO, 2010).

9. 4 Capacitación espermática *in vitro*

La muestra de espermatozoides se dividió en dos alícuotas de 500 µL (~90 x 10⁶ espermatozoides), las cuales representaron la condición no capacitante (NC) y

capacitante (CAP). La alícuota CAP se incubó en medio BWW-suplementado con 0.1% de Albumina sérica bovina (BSA), Piruvato de Na⁺ y Lactato de Na⁺ a pH 7.2, completando un volumen final de 1 mL, en un ambiente a 37°C y con 5% de CO₂ durante 6 horas (Cervantes et al., 2008; Rodríguez-Tobón et al., 2016).

9. 5 Análisis de la [Ca²⁺]_i en célula única

De la muestra de espermatozoides NC y CAP, se tomó una alícuota de 5 x 10⁶ de espermatozoides que se incubaron con Fluo-3-AM (2 μM) (excitación/emisión: 490nm - 515nm) por 30 minutos a 37 °C bajo 5% de CO₂ protegidos de la luz (Mata-Martínez, Darszon, y Treviño, 2018). Posteriormente, se centrifugaron los espermatozoides a 1,500 rpm (300 g) durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 200μL de medio BWW suplementado con HCO₃⁻ y BSA (pH 7.2) y medio BWW sin suplementar (pH 7.2), según la condición de las células. Se colocaron 20μL de los espermatozoides cargados con Fluo-3-AM (NC y CAP), sobre un cubreobjetos con poli-L-lisina al 0.03% para facilitar la adhesión de las células a la superficie. Posteriormente, los espermatozoides se colocaron en cámaras de registro, se observaron y registraron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71, mediante un filtro de excitación D485/50X, un filtro de emisión HQ535/50M y empleando como fuente de iluminación, un LED de 465 nm (Cairn research). Dicho sistema se acopló a un controlador de LEDs, que nos permitió dar pulsos de iluminación por un tiempo de exposición de 15 ms, y se tomó una imagen cada segundo. Para visualizar y registrar las imágenes se utilizó una cámara de CCD (Andor technology). El protocolo de estimulación consistió en la adición con micropipeta de los siguientes compuestos: progesterona (300 nM, 1 μM y 3 μM), ionomicina (5 μM), MnCl₂ (5 mM), NH₄Cl (10 mM) y RU1968 (inhibidor específico para CatSper) (5 μM) (Chávez et al., 2017; Mata-Martínez et al., 2018).

Las imágenes de fluorescencia para Ca²⁺ se analizaron con el programa Andor IQ2 e ImageJ 1.52 (National Institute of Health), seleccionando la cabeza como región de interés en cada espermatozoide. Los valores de intensidad de fluorescencia se

normalizaron con la ecuación: $(F-F_{Mn}) / (F_{max}-F_{Mn})$ (López-Torres et al., 2017; Mata-Martínez et al., 2018).

9. 6 Evaluación de la movilidad espermática

Después de la capacitación, las células se dividieron en dos alícuotas de 20 μ L (tubo 1 y tubo 2; 10×10^6 de espermatozoides), se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se resuspendieron en medio BWW a pH 7.2 (tubo 1) y pH 8.0 (tubo 2). Las alícuotas se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se estimuló la movilidad con 4-aminopiridina (base débil y estimulador de CatSper por la elevación del pH_i; Achikanu et al., 2018) y se inhibió con RU1968 (5 μ M). Se cargaron 5 μ L de cada alícuota de espermatozoides en una cámara Spermatrack Proiser a 37 °C y se colocó inmediatamente en la platina calentada (37 °C) de un microscopio vertical NIKON modelo ECLIPSE Ci-L con una cámara acoplada Basler Ace del sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), versión 5.4 Microptic, compuesto por una computadora con el Software Sperm Class Analyzer 5 (López-Torres *et al.*, 2017; WHO, 2010). Se determinó el porcentaje de movilidad: progresiva, no progresiva y estática, además, de los parámetros cinemáticos sin la adición de estímulos y 300 segundos después su aplicación. Se recopilaron ~10 fotografías en video en donde se rastrearon al menos 300 espermatozoides (hasta 15 campos). Los criterios para determinar hiperactivación fueron: velocidad curvilínea (VCL) $\geq 150\mu\text{m/s}$, linealidad (LIN) $<50\%$ y amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH) $\geq 7\mu\text{m}$. Las evaluaciones del efecto por el estimulador (4-AP) y el inhibidor (RU1968) sobre la hiperactivación se realizarán en paralelo con controles no tratados (espermatozoides en medio BWW, pH 7.2 y 8.0) (López-Torres et al., 2017; WHO, 2010).

9. 7 Evaluación del potencial de membrana

En un tubo de cristal de 700 μ L con medio BWW se adicionó el colorante DISC₃-(5) (1 μ M), se agregaron los espermatozoides según su condición (CAP Y NC) (10×10^6 espermatozoides) y se incubaron 5 minutos a 37°C. Posteriormente se

incubaron durante 2 minutos los espermatozoides con 1 μ L (500 nM) de carbonil cianida m-cloro fenil hidrazona (CCCP, desacoplante mitocondrial). Finalmente, se adicionó 1 μ M de valinomicina seguida de adiciones secuenciales de KCl como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Adiciones secuenciales de KCl para la evaluación del Em plasmática.

KCl inicial en medio BWW: 5 mM

KCl Stock	Volumen adicionado	KCl adicionado	[KCl] final
500 mM	5 μ l	2.5 mM	7.5 mM
1 M	5 μ l	5 mM	12.5 mM
2 M	5 μ l	10 mM	22.5 mM
2 M	10 μ l	20 mM	42.2 mM

La fluorescencia se registró en células en condición NC y CAP (Chávez *et al.*, 2013). Las medidas de potencial de membrana en población se realizaron en un espectrofluorómetro SLM Aminco, operado por el software Olis (Bogart, GA, USA). Para la excitación del colorante DISC₃-(5), se empleó un controlador LED y su correspondiente fuente de poder (700 mA). El LED empleado es de 650 nm, con un sistema de filtros de excitación/emisión de 640/670 nm, respectivamente (Chroma Technology). Los valores teóricos del potencial de membrana plasmática se calcularon empleando la Ecuación de Nernst, asumiendo la $[K^+]_i$ de 120 mM, de acuerdo a como lo determinó Babcock (1983) en espermatozoides de bovino. El potencial de membrana final se obtuvo al interpolar los valores teóricos con la unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) registradas de cada trazo (Chávez *et al.*, 2013).

9. 8 Registros electrofisiológicos de espermatozoides

Para este estudio utilizamos espermatozoides del epidídimo con gota citoplasmática. Se colocó una alícuota de 50 μ l sobre un cubreobjetos de vidrio de una cámara de registro a temperatura ambiente (22°C). Los espermatozoides se lavaron repetidamente con la solución fisiológica HS a pH 7.4 (con NaOH). Se formó un sello eléctrico entre la pipeta y la membrana aplicando la punta de la pipeta a la gota citoplasmática. Para los registros de corrientes monovalentes de CatSper después de romper el sello y entrar en la célula completa, la solución de HS se cambió por una solución de baño libre de cationes divalentes (DVF) a pH 7.4 (con NaOH). La solución de la pipeta contenía en mM: 135 Cs-metanosulfonato, 5 CsCl, 10 EGTA, 5 Na₂ATP, 10 HEPES y pH 7,0 (con CsOH). Los diferentes compuestos utilizados para alterar la función (ganancia o pérdida) del canal CatSper se agregaron directamente a la cámara de registro. Para hacer las pipetas se utilizó un restirador horizontal (P-2000 Sutter Instrument Co., Novato, CA, EE. UU.) Para hacer las pipetas y la punta se pulió con calor utilizando una micro-forja (Narishige MF-83, Scientific Instrument Lab, Setagaya-Ku, Tokio, Japón). La resistencia eléctrica de las pipetas después de llenarlas con solución fue de 10-15 M Ω . Las células se estimularon aplicando un protocolo estándar de rampa de voltaje de -80 mV a +80 mV con un potencial de mantenimiento de 0 mV cada 5 segundos utilizando un amplificador Axopatch 200 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.) conectado a un convertidor digital DigiData 1200 (Molecular Devices). Los archivos de datos se almacenaron en el disco duro de una PC. Los datos se analizaron utilizando el software pClamp 6 (Molecular Devices) y se analizaron fuera de línea con los programas Clampfit 10.7 (Molecular Devices) y SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc. San José, CA, EE. UU.).

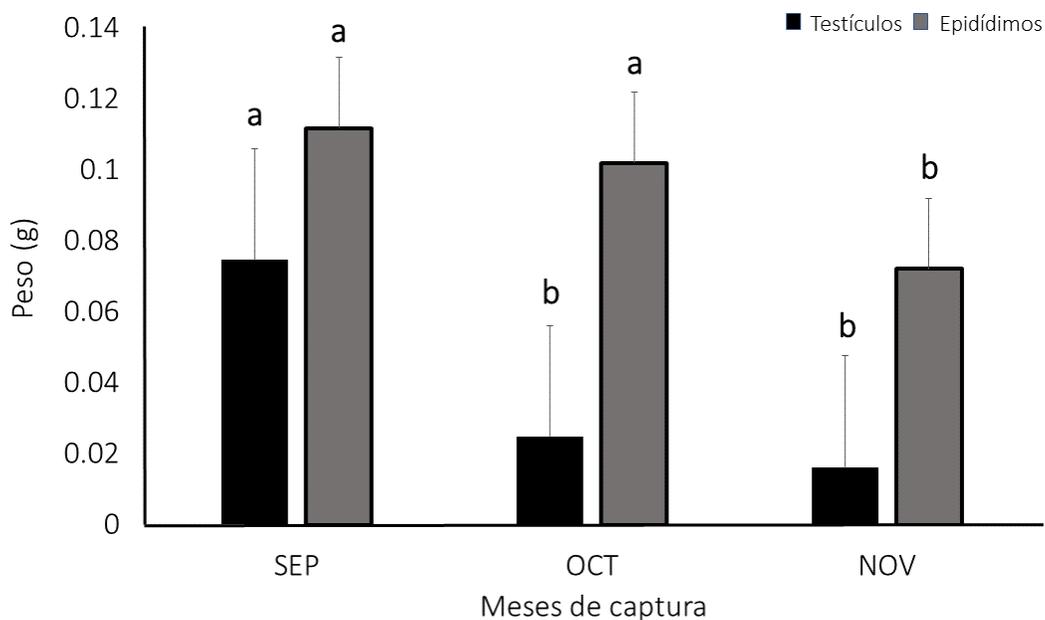
9. 9 Análisis Estadístico

Todos los datos se exportaron y analizaron usando Microsoft Excel Versión 2002. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico R Studio Versión 1.2.5033. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar (E.E), determinando diferencias significativas entre los grupos usando ANOVA y una prueba post hoc Tukey-Kramer; utilizando como matriz de comparación entre datos, el peso de testículos y epidídimos, concentración de espermatozoides, movilidad espermática, potencial de membrana e hiperactivación. Se consideraron diferencias a partir de una significancia de $p < 0.05$. Los resultados de electrofisiología se presentan como la media \pm E.E. Las diferencias entre los datos medidos se analizaron con una prueba t de Student pareada. Se utilizó un valor de $p < 0.01$ para denotar la diferencia estadística.

10. Resultados

10. 1 Peso de testículos y epidídimos

Los valores del peso testicular de *Corynorhinus mexicanus* muestran una disminución gradual significativa entre los meses de captura, registrando el valor más bajo en el mes de noviembre (0.0162 ± 0.0018 g). El peso epididimario completo registró el valor más alto en septiembre (0.111 ± 0.0093 g), disminuyendo significativamente al comparar con octubre y noviembre (Gráfica 1).

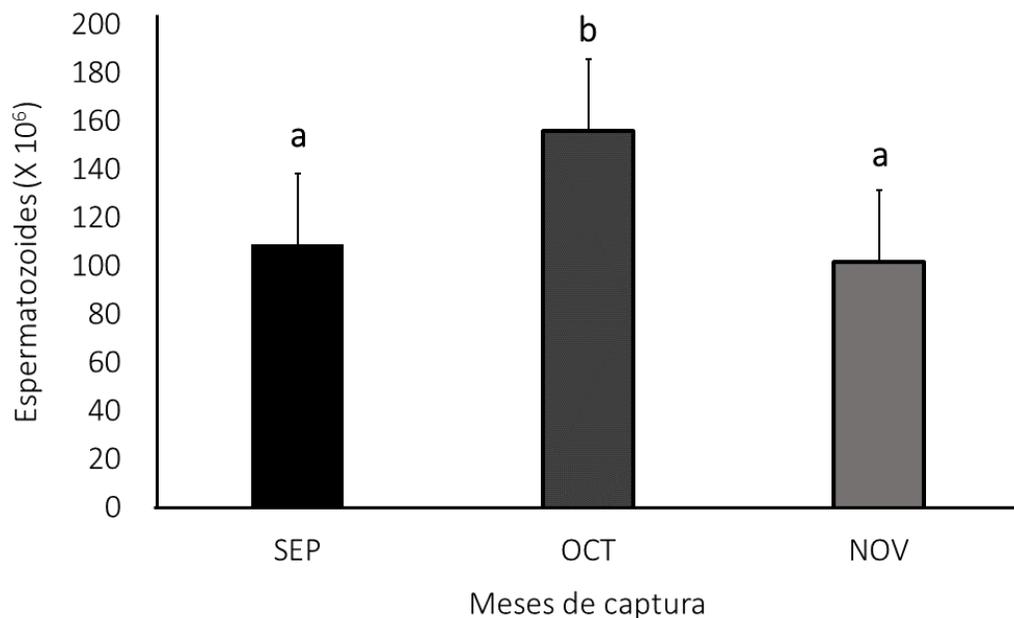


Gráfica 1. Peso testicular y epididimario de *Corynorhinus mexicanus* durante el periodo de almacenamiento prolongado. Letras indican diferencias significativas cuando se comparan los tres distintos meses de captura respecto al peso del órgano, ANOVA ($p < 0.05$) seguido de Tukey Kramer post hoc test. SEP: septiembre, OCT: octubre y NOV: noviembre. $n=3$ por mes.

10. 2 Evaluación espermática

10. 2. 1 Concentración de espermatozoides

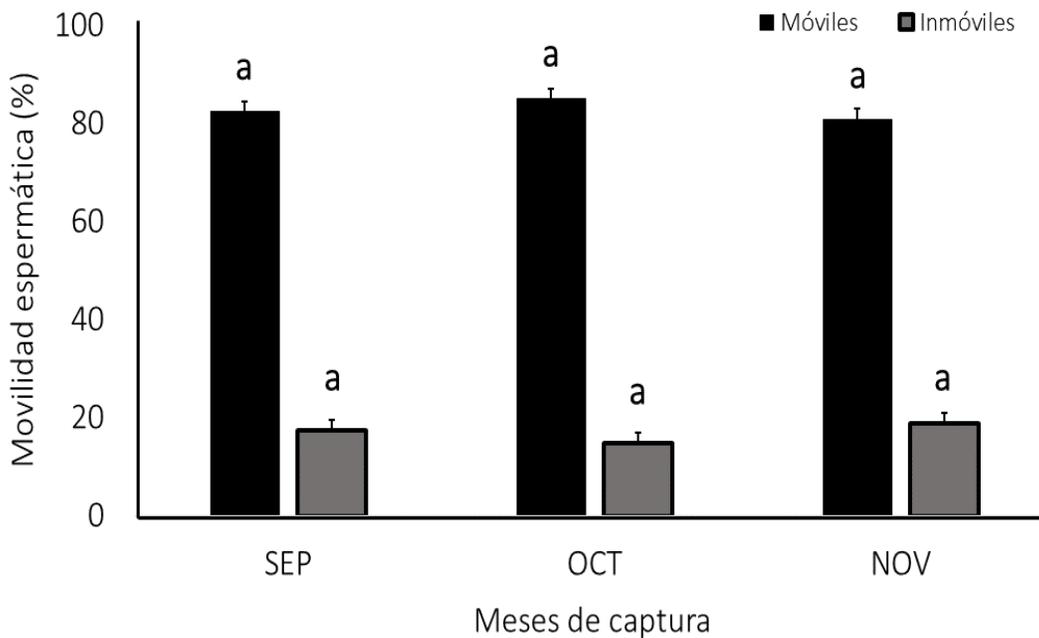
La concentración espermática se determinó por recuperación de los espermatozoides móviles de la región caudal del epidídimo después de Swim-up. El máximo valor se observó en el mes de octubre con $156 \times 10^6 \pm 7$ células/mL, presentando una disminución significativa cuando se comparó con los meses de septiembre ($108 \times 10^6 \pm 15.5$ células/mL) y noviembre ($101 \times 10^6 \pm 6.18$ células/mL) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Concentración de espermatozoides (células X 10⁶) obtenida de la región caudal epididimaria de murciélagos *Corynorhinus mexicanus* capturados de septiembre a noviembre. Las barras indican la media \pm DE de n= 3 por mes. Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.05$) cuando se compara entre los diferentes meses de captura, usando ANOVA seguido de una prueba post hoc de Tukey-Kramer. SEP: septiembre, OCT: octubre y NOV: noviembre.

10. 2. 2 Movilidad espermática total

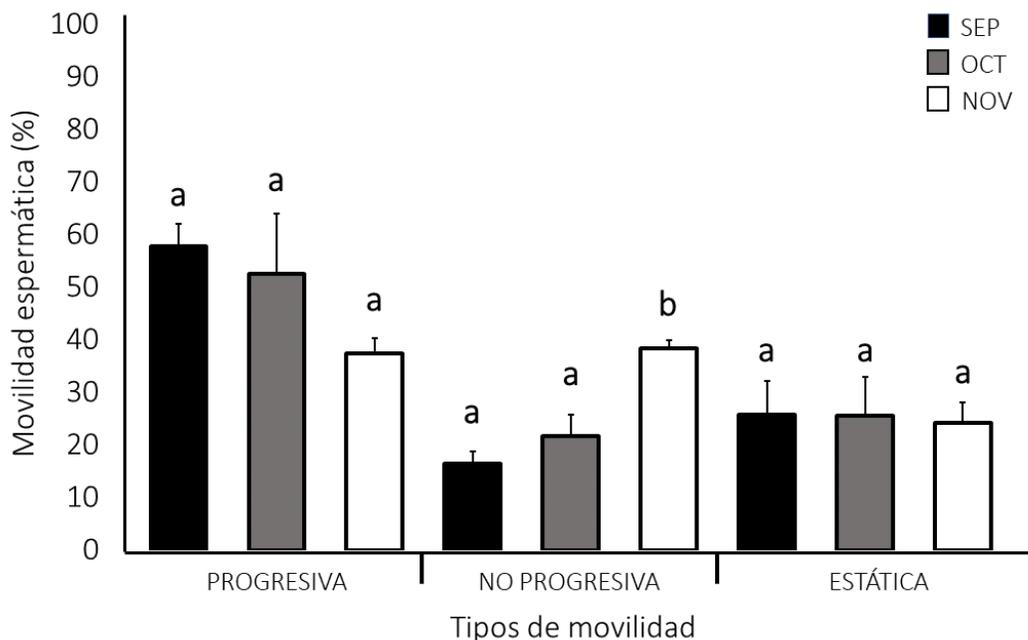
El análisis de movilidad en espermatozoides se realizó con base al procedimiento microscópico descrito por WHO (2010), considerando a los espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo. El mayor porcentaje de movilidad obtenido durante los meses de almacenamiento espermático (septiembre-noviembre) se registró en el mes de octubre (85%) presentando una disminución no significativa al comparar con los meses de septiembre y noviembre (Gráfica 3).



Gráfica 3. Porcentaje de espermatozoides móviles obtenidos de la región caudal epididimaria de murciélagos *Corynorhinus mexicanus* capturados durante el periodo de almacenamiento. Las barras indican las medias \pm D.E de $n=3$ por mes. Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.05$) cuando se compara entre los diferentes meses de captura, usando ANOVA. SEP: septiembre, OCT: octubre y NOV: noviembre.

10. 2. 3 Análisis de los patrones de movilidad espermática por CASA

Con la finalidad de hacer un análisis más detallado de la movilidad, se evaluó la movilidad progresiva, no progresiva y espermatozoides estáticos o inmóviles en los células de la región caudal del epidídimo de *Corynorhinus mexicanus*. Se observó una variación en el porcentaje espermatozoides estáticos, al comparar entre los meses de captura. La movilidad no progresiva mostró un aumento gradual significativo hacia al mes de noviembre con una diferencia de ~20% en comparación con septiembre. Sin embargo, la movilidad progresiva disminuyó de septiembre (58%) a noviembre (37%) sin diferencias estadísticas.



Gráfica 4. Porcentaje de los tipos de movilidad en espermatozoides de la región caudal epididimaria de murciélagos *Corynorhinus mexicanus*. Las barras indican la medias \pm D.E de n=3 por mes. Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.05$) cuando se compara entre los diferentes meses de captura cada tipo de movilidad, usando ANOVA seguido de una prueba post hoc de Tukey-Kramer. SEP: septiembre, OCT: octubre y NOV: noviembre.

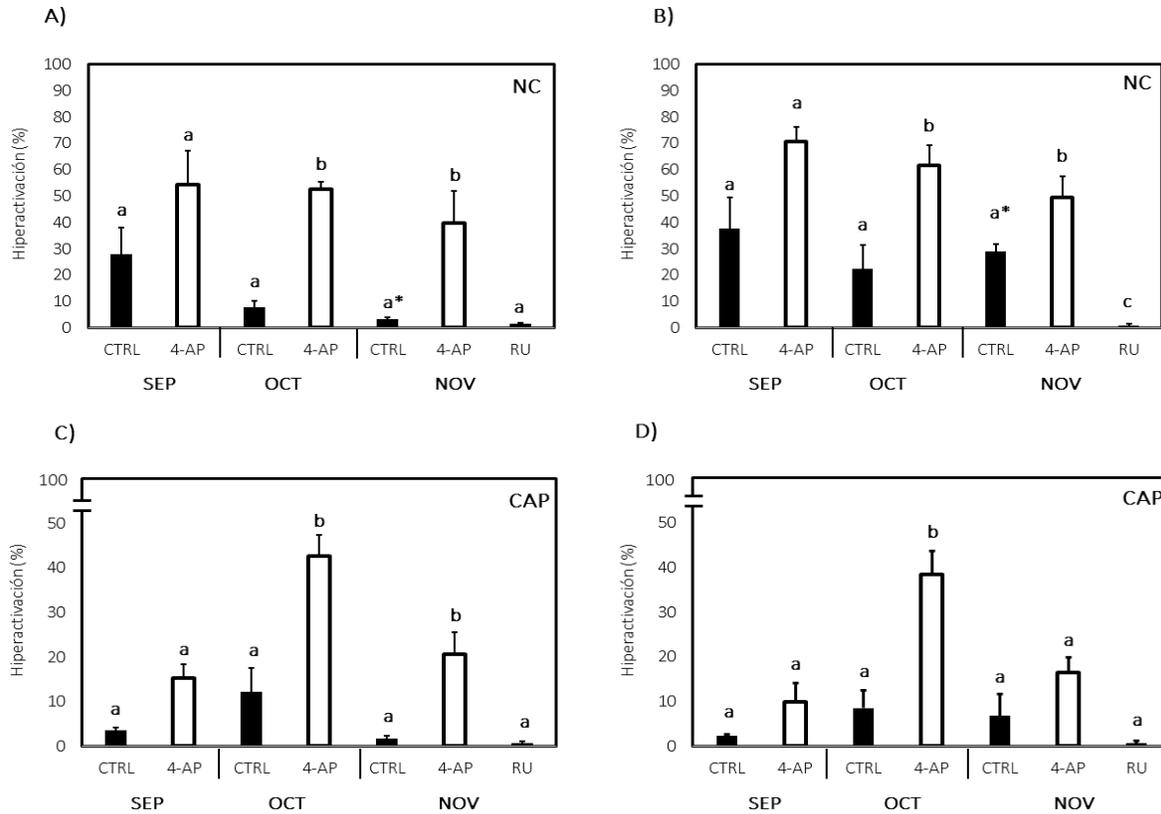
10. 2. 4 Análisis de movilidad hiperactivada por CASA

Con el fin de evaluar la hiperactivación, considerando la importancia del pH en la fisiología del espermatozoide y su variación en el tracto reproductor de la hembra, evaluamos el patrón de movilidad en condiciones NC y CAP a pH 7.2 y 8.0

El efecto de 4-AP indujo un aumento en el porcentaje de hiperactivación respecto al grupo control, en cada mes de captura, bajo condición NC a ambos pH, siendo significativo en octubre y noviembre. Sin embargo, en ausencia de 4-AP (grupo control), el máximo porcentaje de hiperactivación se registró en el mes de septiembre en condiciones NC a pH 7.2 (28%) y pH 8 (38%) (Gráfica 5A y B). También se observó que la alcalinización (pH 8.0) en condiciones NC registra un aumento en el porcentaje de la hiperactivación en comparación con el pH 7.2, en ausencia y presencia de 4-AP (Gráfica 5B).

Por otra parte, en condiciones CAP, el efecto de 4-AP respecto al grupo control en cada mes de captura, induce un aumento significativo en la hiperactivación, en los meses de octubre (pH 7.2 y 8.0) y noviembre (pH 7.2) (Gráfica 5C y D). En ausencia de 4-AP (grupo control), en el mes de octubre se registró el mayor porcentaje de este patrón de movilidad (12% pH7.2 y 9% pH 8.0). Sin embargo, las condiciones CAP en ambos pH, no estimularon un aumento en el patrón de movilidad hiperactivado de los espermatozoides, al comparar con las condiciones NC.

Por último, se estudió el efecto de RU1968 sobre los espermatozoides en el mes de noviembre, observando la inhibición de la hiperactivación en ambas condiciones (CAP y NC) y pH (7.2 y 8.0) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de hiperactivación en espermatozoides de la región caudal epididimaria del murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Las barras indican la media \pm E.E de n=3 por mes. **A)** Condición no capacitante (NC) a pH 7.2; **B)** NC a pH 8; **C)** Condición capacitante (CAP) a pH 7.2 y **D)** CAP a pH 8. Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.05$) cuando se comparan los diferentes meses de captura con la respuesta de 4-AP. * indica diferencias significativas cuando se comparan los diferentes meses de captura con el pH; usando t-Student y/o ANOVA seguido de una prueba post hoc de Tukey-Kramer. SEP: septiembre, OCT: octubre; NOV: noviembre; CTRL: Control; RU; RU41968 y 4-AP: 4-Aminopiridina.

10. 3 Evaluación de indicadores bioquímicos en la capacitación espermática

10. 3. 1 Análisis de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única

La representación esquemática y la dinámica de fluorescencia de Ca^{2+} , muestra la respuesta de los espermatozoides al adicionar P4 (0.3 μ M, 1 μ M y 3 μ M), NH_4Cl y RU1968 (Figura 8A y B; Gráfica 6A y B) en experimentos de célula única. Observamos que P4 aumenta significativamente el porcentaje de respuesta a $[Ca^{2+}]_i$ respecto al medio de registro (MR; control) en espermatozoides bajo la condición NC en octubre y noviembre (meses de captura de *Corynorhinus mexicanus*). Esta respuesta parece estar relacionada con la concentración (ascendente) de P4, registrando el mayor aumento a 3 μ M (Gráfica 6A y B; NC). La P4 a 0.3 μ M induce un aumento no significativo de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados de octubre y noviembre (Gráfica 6A y B; CAP). Sin embargo, en noviembre se registró una disminución no significativa de $[Ca^{2+}]_i$ en la concentración 3 μ M, respecto al control (Gráfica 6B; CAP).

La adición de NH_4Cl indujo un aumento no significativo de Ca^{2+}_i en espermatozoides de la condición NC y CAP (Gráfica 6), y una ligera disminución no significativa en espermatozoides capacitados de noviembre (Gráfica 6B: CAP). Por otro lado, se determinó si RU1968 inhibe el aumento de Ca^{2+} estimulado por P4 o NH_4Cl , observando que, el efecto de RU1968 disminuye el influjo de Ca^{2+} sin diferencia estadística al comparar con el grupo control en ambos meses y condiciones (NC y CAP) (Gráfica 6).

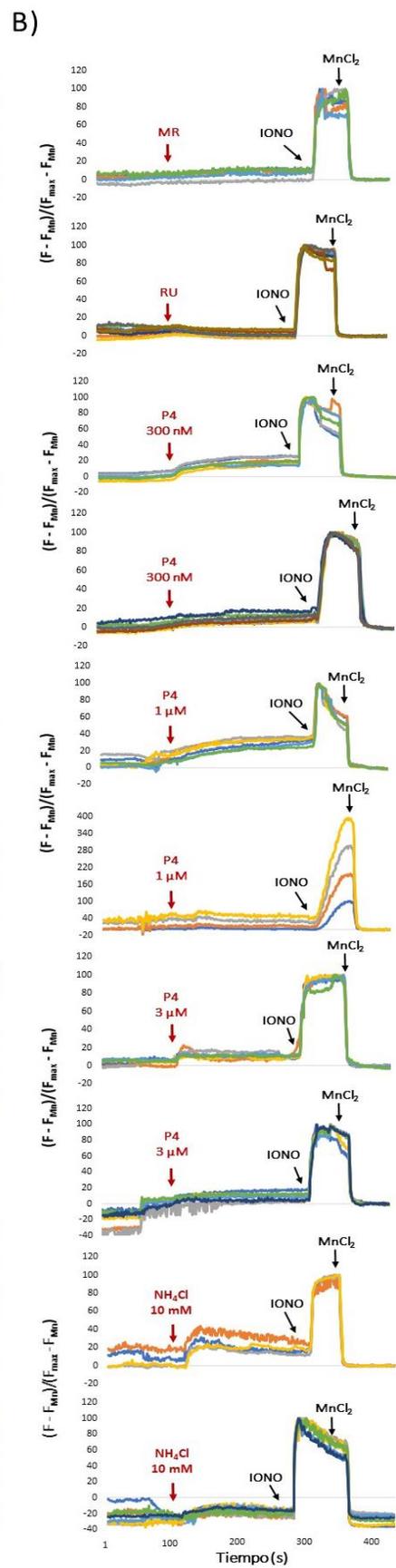
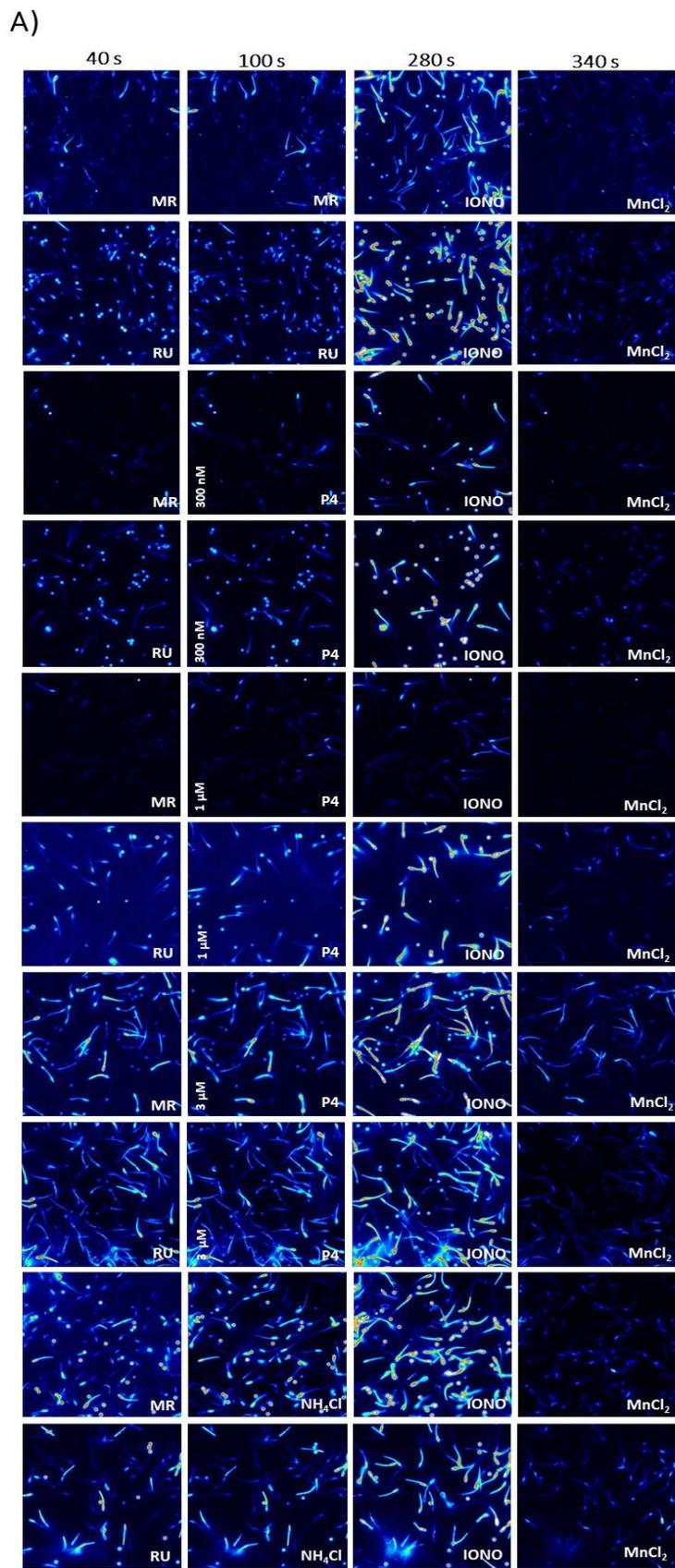


Figura 8. Flujo de Ca^{2+} en espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo del murciélago *Corynorhinus mexicanus* bajo condiciones no capacitantes. A) Imágenes representativas de fluorescencia de espermatozoides cargados con el colorante sensible a Ca^{2+} Fluo-3-AM. **B)** Cada trazo corresponde a la dinámica de $(Ca^{2+})_i$ de una célula obtenido de la respuesta a la adición de medio de registro (MR), RU1968 (RU), progesterona (P4) [0.3 μ M, 1 μ M y 3 μ M], NH_4Cl (10 mM), ionomicina (IONO) (5 μ M) y $MnCl_2$ (5 mM) de las células. Las flechas indican la adición de cada compuesto. $n \geq 3$ células analizadas.

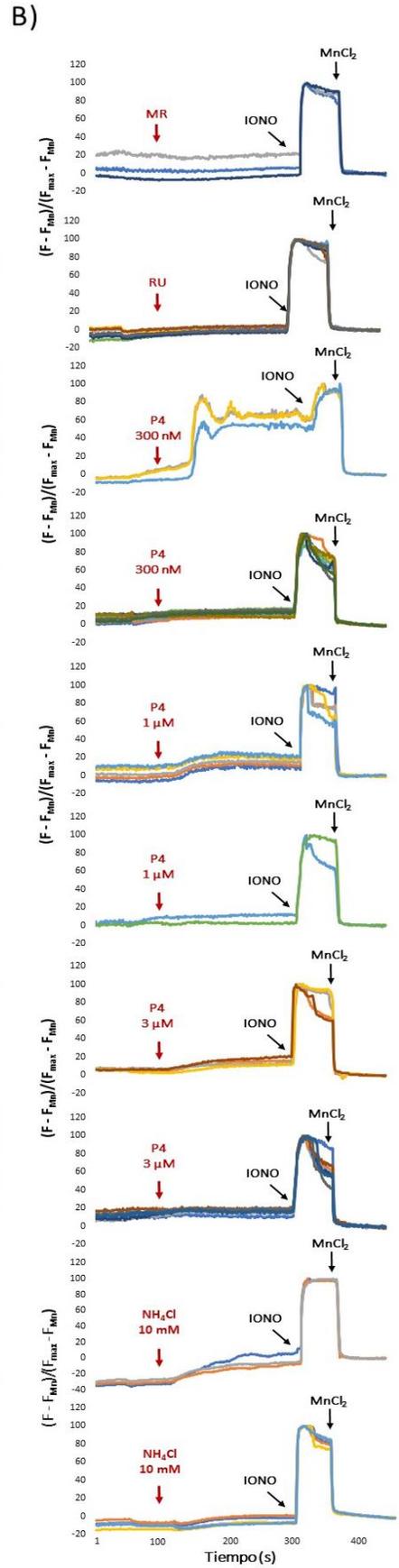
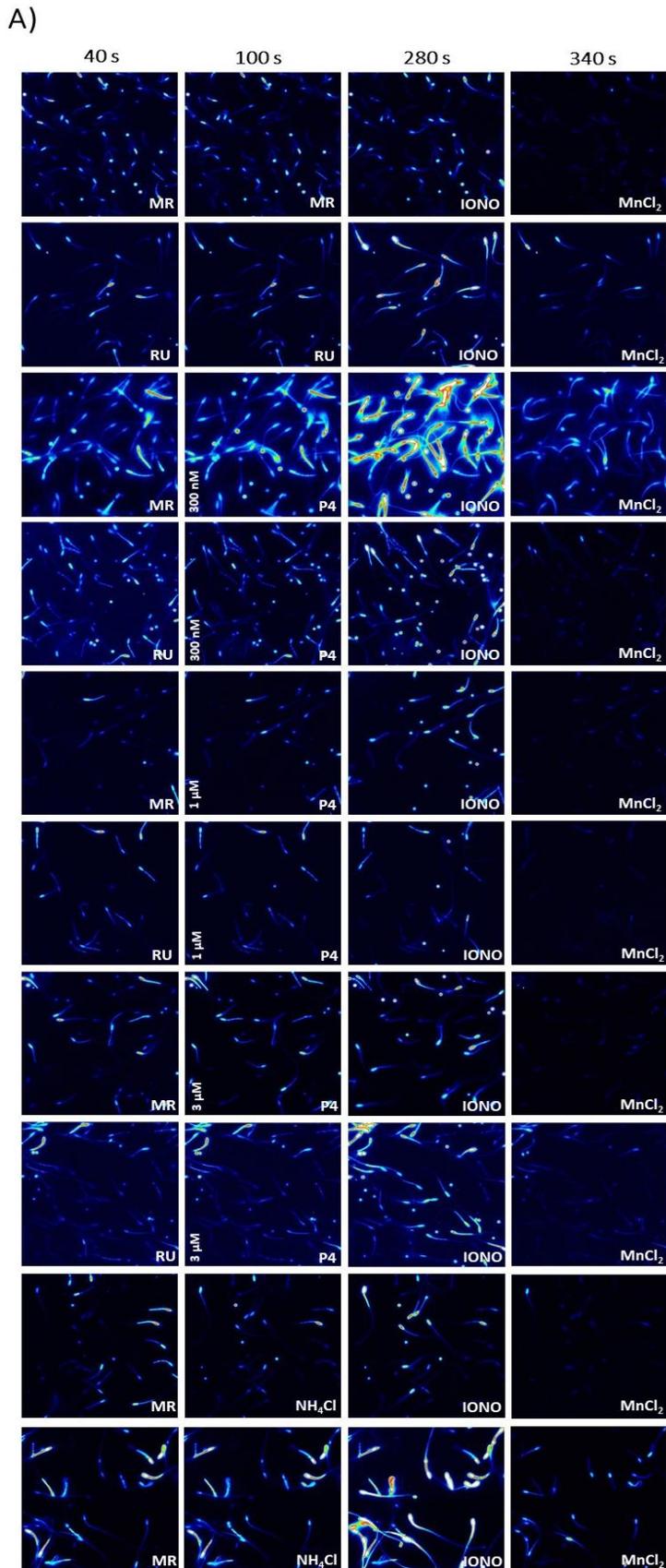
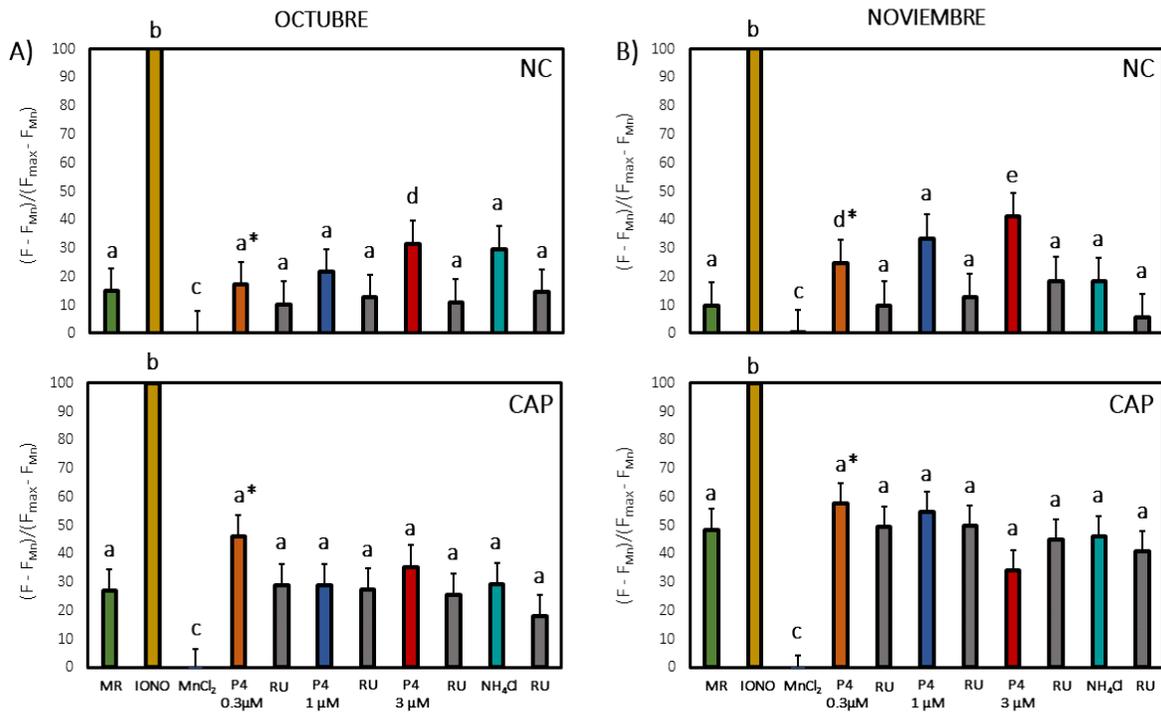


Figura 9. Flujo de Ca^{2+} en espermatozoides del murciélago *Corynorhinus mexicanus* bajo condiciones CAP. A) Imágenes representativas de fluorescencia de espermatozoides cargados con el colorante sensible a Ca^{2+} Fluo-3-AM. **B)** Cada trazo corresponde a la dinámica de (Ca^{2+}); de una célula obtenido de la respuesta a la adición de medio de registro (MR), RU1968 (RU), progesterona (P4) [0.3 μM , 1 μM y 3 μM], NH_4Cl (10 mM), ionomicina (IONO) (5 μM) y MnCl_2 (5 mM) de las células. Las flechas indican la adición de cada compuesto. $n \geq 2$ células analizadas.



Gráfica 6. La P4 y NH₄Cl incrementan la [Ca²⁺]_i en espermatozoides del murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Resultados normalizados respecto a IONO y MnCl₂. Las barras indican la media ± E.E de n=3 por mes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas estadísticamente (p< 0.05) cuando se compararon entre las diferentes concentraciones de progesterona, usando ANOVA seguido de Tukey-Kramer una prueba post hoc. * indica diferencias significativas cuando se comparan las diferentes concentraciones de P4 entre condición **A)** Octubre: Espermatozoides en condición NC y CAP y **B)** Noviembre: Espermatozoides en condición NC y CAP. Medio de registro (MR), RU1968 (RU) (5 μM), Progesterona (P4) [0.3μM, 1μM y 3μM], NH₄Cl (10 mM), Ionomicina (IONO) (5 μM) y MnCl₂ (5 mM). n ≥ 3 células analizadas.

10. 3. 2 Medidas del potencial de la membrana plasmática

Por medio de experimentos fluorométricos de población celular, se determinaron los valores del Em en espermatozoides bajo condiciones CAP y NC a pH 7.2 y 8.0 durante el almacenamiento espermático prolongado de *Corynorhinus mexicanus*. Se pudo observar que, los cambios del Em fueron variables entre los meses de captura, tanto en condiciones NC y CAP en ambos pH. Se registraron valores en el Em de espermatozoides NC a pH 7.2 que van de -70 (septiembre) a -82 mV (noviembre), mostrando una hiperpolarización a pH 8.0 (-83 a -95 mV) (Figura 9A). Sin embargo, después de la capacitación, los espermatozoides exhibieron una hiperpolarización significativa en el mes de noviembre a ambos pH, registrando hasta -137 mV (Figura 9A).

Las adiciones de valinomicina y KCl se realizaron como método de calibración para determinar el Em en reposo de las células en las diferentes condiciones experimentales (Figura 9B).

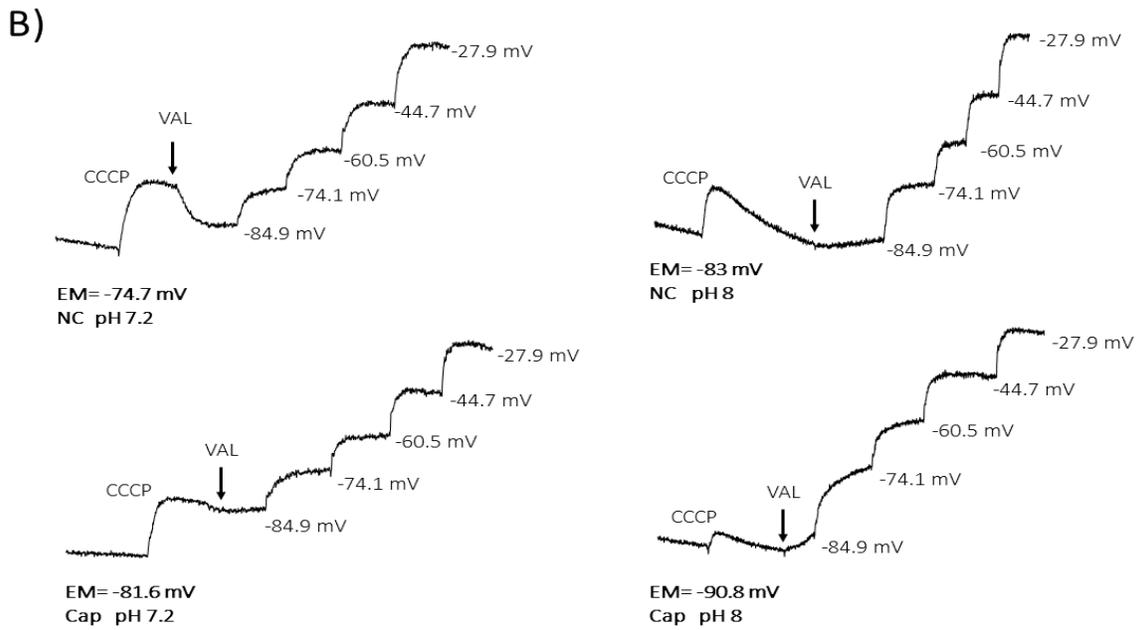
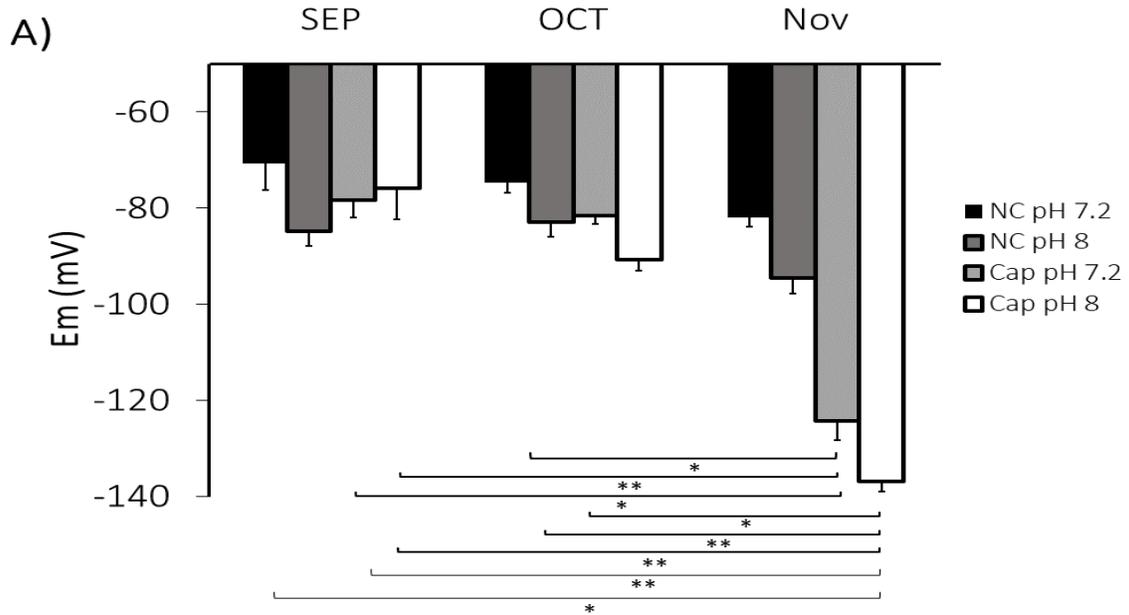


Figura 9. La capacitación y la alcalinización del medio extracelular inducen una hiperpolarización en espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus*. **A)** Gráfica de medidas de emisión de fluorescencia en espermatozoides capacitados (CAP) y no capacitados (NC) bajo diferentes condiciones experimentales: pH 7.2 y pH 8. **B)** Trazos representativos de doce experimentos que muestran la calibración obtenida agregando valinomicina (VAL) seguida de adiciones secuenciales de K⁺. *indica p ≤ 0.05 y ** indica p ≤ 0.001.

10. 3. 3 Registros electrofisiológicos de espermatozoides

Los registros electrofisiológicos por patch-clamp realizados por el Dr. Gerardo Orta en espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus*, indican que el canal CatSper se regula positivamente por la alcalinización inducida por NH_4Cl aumentando la amplitud de la corriente de CatSper (I_{CatSper}) (Figura 10C). La activación por NH_4Cl fue bloqueada por el inhibidor específico RU1968 (Figura 10C) presentando diferencias estadísticamente significativas al comparar con el control (Figura 10D).

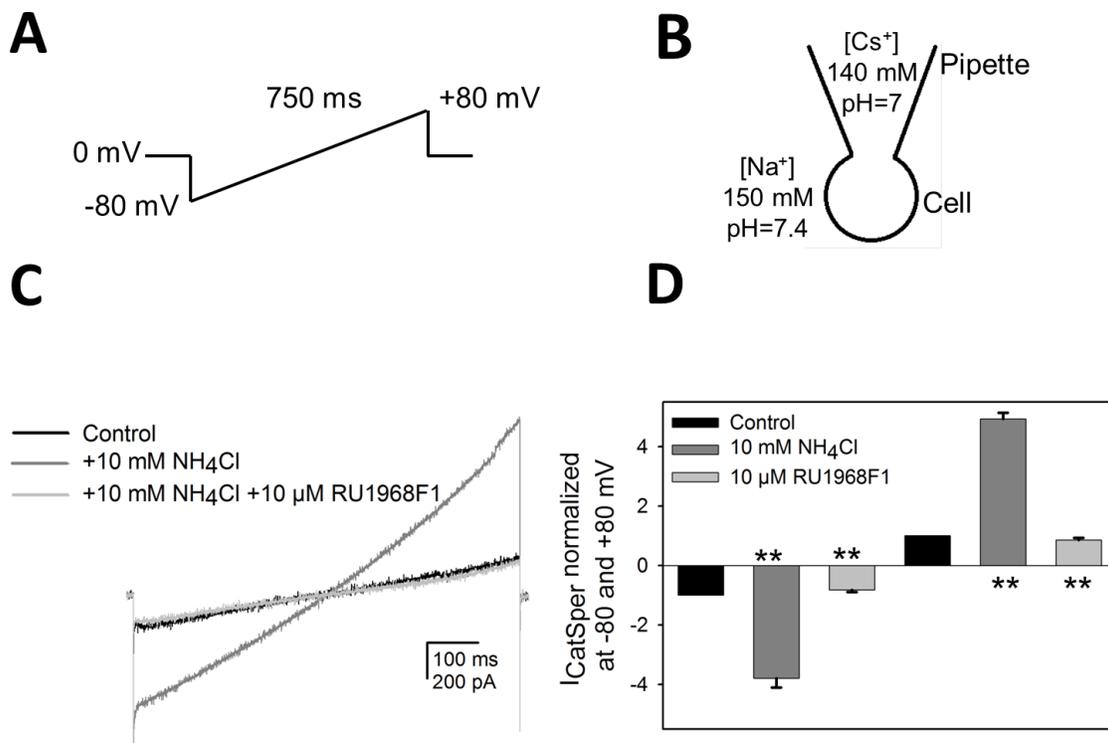


Figura 10. Los registros de patch-clamp de células enteras de espermatozoide de *Corynorhinus mexicanus* revelan corrientes catiónicas monovalentes con el sello distintivo del canal CatSper. **A)** Protocolo de rampa de voltaje estándar utilizado para obtener las corrientes macroscópicas del canal CatSper. **B)** Modalidad de célula completa y soluciones mediante registros de corriente monovalente. **C)** Una familia de corrientes provocadas en un espermatozoide representativo mediante el protocolo de voltaje aplicado que se muestra en A en las siguientes condiciones: control (traza negra), después de alcalinización con NH_4Cl (trazo gris oscuro) y en presencia del inhibidor de CatSper RU1968F1 (traza gris). **D)** Resumen de los resultados obtenidos de cinco murciélagos diferentes en las condiciones experimentales anteriores. Los datos se normalizaron con respecto al control y se presentan como E.E. (** $p < 0.01$).

11. Discusión

Corynorhinus mexicanus es un murciélago insectívoro de zonas templadas (endémico de México) de la familia Vespertilionidae, presenta un patrón reproductivo monoéstrico estacional regulado por factores ambientales como la temperatura y la precipitación que a su vez regulan la disponibilidad de alimento, importante para la reproducción (León-Galván et al., 2005; López-Wilchis, 1989). En el macho existe una asincronía temporal en sus funciones reproductivas. Es decir, la espermatogénesis se experimenta en verano, el máximo desarrollo de las glándulas accesorias y su actividad reproductiva (copula) en otoño (León-Galván et al., 2005). Por lo tanto, la variación estacional de la espermatogénesis implica una involución completa de los testículos en otoño, disminuyendo totalmente su peso en noviembre (Gráfica 1), lo cual, es similar con lo reportado por León-Galván et al. (2005). De acuerdo con datos histológicos de los testículos, se indicó que durante la regresión testicular se observa la involución de los túbulos seminíferos y disminución en número de células de Sertoli, así como, una degeneración vacuolar (López-Wilchis, 1989). Por otro lado, León-Galván et al. (2005) reporta el inicio del ciclo epididimario de *Corynorhinus mexicanus* en junio, en donde las regiones anatómicas *caput* y *corpus* alcanzaron su pico máximo de crecimiento en agosto y septiembre, mientras la región caudal presenta su peso máximo en los meses de septiembre (León-Galván et al., 2005) y octubre (Cervantes et al., 2008; Arenas-Ríos et al., 2016). Sin embargo, en este estudio se observa (Gráfica 1) una involución gradual del peso epididimario, que se podría relacionar con la pérdida estacional de su fisiología al no participar en el almacenamiento espermático y al aumento de la actividad reproductiva del murciélago (copulas) (Crichton y Krutzsch, 2000; León-Galván et al., 2005).

En comparación con la mayoría de los mamíferos, en los murciélagos vespertiliónidos, incluido *Corynorhinus mexicanus*, se ha registrado un almacenamiento espermático prolongado que implica en el macho la retención de los espermatozoides dentro de la *cauda* epididimaria durante varios meses (cinco).

El almacenamiento prolongado de los espermatozoides es una estrategia reproductiva derivada de la asincronía en su patrón reproductivo, que permite a los machos sincronizarse con el arribo de hembras receptivas, permitiendo el éxito en los apareamientos y asegurando la fecundación (León-Galván et al., 1999; León-Galván et al., 2005).

León-Galvan et al. (1999), relacionan las características morfológicas del epidídimo con la presencia y/o ausencia de espermatozoides, describiendo que cuando se encuentran almacenados, la *cauda* epididimaria se desarrolla, es decir, se hincha y se vuelve bulbosa. El análisis del número de espermatozoides de las diferentes regiones anatómicas del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) durante el almacenamiento prolongado de espermatozoides, indica un aumento en la región caudal al final del mes de octubre (Arenas et al., 2016). En el presente trabajo obtenemos el mayor número de células en el mes octubre (156 ± 7 espermatozoides/mL) (Gráfica 2), confirmando lo reportado por Arenas et al. (2016) y Rodríguez-Tobón et al. (2016). Sin embargo, la determinación del número de espermatozoides se consideró a partir de células obtenidas en Swim-up. Es por esta razón, que nuestro resultado (Gráfica 2) presenta una diferencia respecto a la concentración, con lo reportado: 325×10^6 células/mL (Arenas et al., 2016) y $260 \times 10^6 \pm 65.1$ células/mL para finales de octubre (Rodríguez-Tobón et al., 2016).

En vertebrados superiores, los espermatozoides maduran durante su tránsito por el epidídimo sometidos a cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, adquiriendo la capacidad de moverse progresivamente, experimentar la capacitación, la reacción del acrosoma y lograr penetrar un ovocito (Robaire et al., 2006). Se ha considerado que el aumento del porcentaje de movilidad en los espermatozoides epididimarios es un indicador de madurez en esta célula. Por lo tanto, el obtener 85% de movilidad total y 58% de movilidad progresiva en espermatozoides epididimarios de *Corynorhinus mexicanus* (Gráfica 3 y 4), nos indica: 1) el estado de maduración de los espermatozoides de la región caudal del epidídimo y por lo tanto 2) la capacidad de los espermatozoides a experimentar la capacitación en el tracto reproductor femenino, indicando el cambio en su patrón de

movilidad, conocido como hiperactivación (Gervasi y Visconti, 2017; Suarez y Ho, 2003).

Además, en el porcentaje de movilidad progresiva observamos una disminución gradual sin diferencia estadística entre los meses de almacenamiento prolongado, lo cual puede deberse a que el epidídimo mantiene estructural y funcionalmente a los espermatozoides, otorgándoles la capacidad de moverse. Este comportamiento también se observó por Wang et al. (2008), revelando en el murciélago *Myotis ricketti* por medio de CASA, la movilidad progresiva de los espermatozoides durante el almacenamiento espermático prolongado, encontraron que el tiempo de almacenamiento de los espermatozoides no afecta su movilidad. Se ha sugerido que un ambiente hiperosmolar en el epidídimo es el responsable de promover la longevidad de los espermatozoides durante el almacenamiento (Crichton et al., 1994). Por otro lado, Arenas-Ríos et al. (2016), describen que las enzimas antioxidantes en el fluido epididimario son elementos de protección de los espermatozoides ante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el almacenamiento.

Dentro del tracto reproductor de la hembra los espermatozoides presentan una movilidad hiperactivada, que tiene el objetivo de permitirles llegar al sitio de fertilización con el ovocito, penetrar las células que lo rodean y fertilizarlo (Gervasi y Visconti, 2016). Los cambios bioquímicos que permiten que los espermatozoides se hiperactiven varían entre especies (Freitas et al., 2017). Dentro de los mecanismos que regulan la movilidad hiperactivada de los espermatozoides se encuentra la producción de ATP y los cambios en el flujo iónico que a su vez es regulado por canales como CatSper y transportadores iónicos de la membrana plasmática (Freitas et al., 2017). Por lo tanto, con el objetivo de evaluar la hiperactivación, considerando la importancia del pH en la fisiología del espermatozoide y su variación en el tracto reproductor de la hembra, analizamos este patrón de movilidad en condiciones NC y CAP. Se determinó que, a diferencia de los espermatozoides de otras especies de mamíferos, los espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus* incubados en condiciones capacitantes (en un medio que

contiene Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina), no mostraron hiperactivación de la movilidad. Sin embargo, la incubación en un pH alcalino aumenta el porcentaje de hiperactivación en condiciones NC y CAP, en comparación con el pH 7.2 (Gráfica 5B). Como era de esperarse, los espermatozoides incubados con 4-AP presentan un aumento significativo en este patrón de movilidad (Gráfica 5). Se ha reportado que la estimulación de los espermatozoides por alcalinización modifica la movilidad de los espermatozoides, principalmente por la activación del canal CatSper, al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Achikanu et al., 2018). Por otro lado, la adición de 4-AP (base débil) estimula la hiperactivación en espermatozoides activando a CatSper al elevar el pH_i , lo que resulta en el aumento de la amplitud de la curvatura y la asimetría del batido flagelar (Achikanu et al., 2018; Ardon et al., 2016; Gu et al., 2004).

Estudios sobre CatSper, concluyen que la ausencia de este canal iónico o deficiencia de cualquier subunidad afecta la hiperactivación espermática y por lo tanto, la fertilidad masculina, impidiendo que el espermatozoide logre fecundar (Pereira et al., 2017).

Uno de los reguladores de la hiperactivación, es el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se ha reportado que a bajas $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el flagelo bate simétricamente, y cuando los niveles aumentan se presentan cambios en el patrón de movilidad del espermatozoide, el cual varía entre especies (fuerte latido flagelar asimétrico de alta amplitud y frecuencia baja), hiperactivando al espermatozoide. Sin embargo, no hay estudios de movilidad en espermatozoides de murciélago que describan las características cinemáticas de los espermatozoides hiperactivos, por lo que sugerimos a CASA por su importancia en el análisis de parámetros de calidad espermática, como una herramienta útil en futuras investigaciones sobre la movilidad de los espermatozoides en esta especie de murciélago.

Se describe que el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se regula a través de su liberación de almacenes internos y por la activación de canales de Ca^{2+} y transportadores (Darszon *et al.*, 2011; Gervasi y Visconti, 2016; Jin y Yang, 2017) de la membrana plasmática. Se ha reportado que la P4 y la alcalinización del citosol en

espermatozoides de humano y de ratón generan un aumento en el influjo de $[Ca^{2+}]_i$, por la activación del canal CatSper (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). Debido a que no se tiene el genoma secuenciado de *Corynorhinus mexicanus*, decidimos explorar por microscopia de fluorescencia la presencia de CatSper por medio de su estimulación con P4 y alcalinización (usando NH_4Cl) en espermatozoides de esta especie, realizando medidas de $[Ca^{2+}]_i$ en experimentos de célula única, empleando el colorante sensible a Ca^{2+} , Fluo-3-AM. Se evaluó si la respuesta de Ca^{2+} inducida por P4 es diferente en espermatozoides capacitados y no capacitados, encontrando que los espermatozoides de esta especie de murciélago promueven la mayor entrada transitoria de Ca^{2+} (Figura 8) con el estímulo de $0.3 \mu M$ de P4 en condiciones capacitantes, sin producir una respuesta significativa a altas concentraciones (Gráfica 6). Sin embargo, en condiciones no capacitantes, el mayor porcentaje de respuesta a P4 se obtuvo a una la concentración máxima (empleada aquí) de $3 \mu M$ (Gráfica 6), lo que indica que la capacitación hace a los espermatozoides más sensibles a P4.

Cervantes *et al.* (2008), emplearon P4 a una concentración de $3.18 \mu M$ para inducir la RA en espermatozoides (previamente capacitados) de *Corynorhinus mexicanus*, durante el almacenamiento espermático prolongado. Encontraron mediante la integridad del acrosoma que la RA aumenta conforme pasa el tiempo de almacenamiento de los espermatozoides. Este reporte, nos indica de manera indirecta que los espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus* responden al efecto de la P4.

La respuesta de Ca^{2+} a P4 se reportó, a través de la activación de CatSper, que está presente en la membrana plasmática de la pieza principal del espermatozoide en humano y ratón (Singh y Rajender, 2015; Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). Este canal se activa por voltaje, alcalinización y ligandos como la P4 y prostaglandinas en espermatozoides de humano a concentraciones submicromolares (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). Se ha reportado por electrofisiología la respuesta de CatSper en espermatozoides de humano con P4 $500 nM$ logrando activar el canal. En contraste con CatSper en espermatozoides de

ratón, la sensibilidad a P4 es reducida, ya que sólo se activa a concentraciones de 50-100 μM (Lishko *et al.*, 2011; Romarowski *et al.*, 2016). La señalización de hormonas esteroideas en células somáticas depende de receptores nucleares desencadenando una respuesta genómica. Sin embargo, los espermatozoides al ser transcripcionalmente silenciosos se sugiere responden a la P4 por una vía no genómica a través de receptores en la membrana plasmática. CatSper se ha sugerido como receptor de la P4. Esta hormona puede unirse en la región extracelular del canal (Lishko *et al.*, 2011) o a la enzima α/β serina hidrolasa que contiene la proteína 2 (ABHD2), la cual elimina por medio del metabolismo de endocannabinoides a 2-AG un inhibidor endógeno del canal, conduciendo a la activación de CatSper (Miller *et al.*, 2016).

Para probar si CatSper se regula por la respuesta a P4 en *Corynorhinus mexicanus*, se registró la señal de Ca^{2+} utilizando NH_4Cl , una base débil que alcaliniza el citosol y activaría a CatSper (Chávez *et al.*, 2018). Se registró un aumento en el porcentaje de respuesta de Ca^{2+} en condiciones NC (Gráfica 6), y CAP del mes de octubre, pero no de noviembre (Gráfica 6B). Estos resultados sugieren que los espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus* responden a la alcalinización intracelular, provocando el influjo de Ca^{2+} , similar a lo reportado en espermatozoides de ratón (Chávez *et al.*, 2018; Orta *et al.*, 2018). Sin embargo, queda por responder por qué el NH_4Cl no induce un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en noviembre.

Por otro lado, la respuesta de Ca^{2+} generada por P4 y alcalinización son inhibidas por RU1968 (Gráfica 6A y B). Estudios de electrofisiología reportan que RU1968 es un importante inhibidor de CatSper al suprimir las señales de Ca^{2+} inducidas por P4 y NH_4Cl en espermatozoides de humanos, ratón y erizo de mar (Rennhack *et al.*, 2018). El mecanismo de acción de RU1968 en el espermatozoide no es claro. Sin embargo, en *Corynorhinus mexicanus* RU1968 también disminuye el influjo de Ca^{2+} en espermatozoides, posiblemente por su participación como inhibidor de CatSper.

Además de la movilidad hiperactivada y el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, dentro de los cambios bioquímicos de la capacitación, se incluye la hiperpolarización del Em

plasmática. El Em se regula por el equilibrio en el flujo y permeabilidad de iones (Ritagliati et al., 2018); dentro del tracto reproductor femenino, los espermatozoides deben regular su Em ante las diferentes concentraciones iónicas que se encuentran hacia el sitio de fertilización con el ovocito (Stival et al., 2016). Por lo tanto, en este estudio medimos los cambios del Em en espermatozoides antes y después de la capacitación en pH 7.2 y 8.0, en los meses de almacenamiento espermático. Observamos que en ambas condiciones hay una variación en los valores del Em que puede estar asociada con la permeabilidad de la membrana plasmática. Sin embargo, en condiciones alcalinas los espermatozoides se hiperpolarizan, lo cual se puede relacionar con la regulación de canales iónicos involucrados en la hiperpolarización del Em.

De acuerdo con Chávez et al. (2013), se relacionó el pH con el canal de K^+ SLO3 al activarlo por alcalinización intracelular, encontrando un aumento en la hiperpolarización de espermatozoides bajo un pH alcalino, además de indicar que en ratones nulos a SLO3 hay una ausencia de hiperpolarización en condiciones NC y CAP. Lo que nos hace plantear dos hipótesis; 1) en los espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus* se encuentra presente el canal SLO3 y 2) la actividad de este canal podría ser el regulador en la hiperpolarización de estas células bajo condiciones CAP, de acuerdo con el aumento en la hiperpolarización que observamos a pH 8.0, dado que el aumento del pH activa los canales SLO3.

Por otro lado, nuestros valores de Em tanto en condiciones de reposo (NC; -82 mV) y CAP (-137 mV) muestran variación a lo reportado por De La Vega-Beltrán et al. (2012) en espermatozoides de ratón, registrando en reposo valores en su Em entre -35 y -45 mV y de hiperpolarización hasta -70 mV después de la capacitación, valores necesarios para que los espermatozoides presenten un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y RA.

Esta diferencia en el Em de los espermatozoides de murciélago se sugiere es causa de una diferencia en la permeabilidad de la membrana. De acuerdo con Chávez et al. (2013), la permeabilidad iónica se modifica con base en la distribución de

diferentes iones, principalmente Cl^- , Na^+ y K^+ , contribuyendo a la estabilidad del E_m en reposo. Se ha reportado que un mecanismo que regula la hiperpolarización es la disminución en la permeabilidad de Na^+ , por el cierre de un canal de Na^+ (Hernández-González et al., 2006).

Por lo tanto, sugerimos que a diferencia de otros mamíferos un valor en el E_m de -82 mV representa un estado de despolarización y de -137 mV de hiperpolarización, en espermatozoides de murciélago.

12. Conclusiones

Los resultados presentados en el presente estudio indican que: 1) los espermatozoides presentan una hiperpolarización significativa del E_m en condiciones capacitantes; 2) los espermatozoides no capacitados tiene valores más negativos en el E_m plasmática en comparación con otros mamíferos como el humano y ratón, 3) la sensibilidad de los espermatozoides a P4, NH_4Cl y RU1968 sugieren la presencia de CatSper al regular el influjo de Ca^{2+} y 4) la ausencia de movilidad hiperactivada en los espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus* no es determinante al no estar descritas las características cinemáticas de movilidad en este murciélago. Por último, podemos concluir que, la capacitación espermática en *Corynorhinus mexicanus* muestra variaciones según a lo descrito en otros mamíferos.

12. Bibliografía

- Arenas-Ríos, E., García-Rosado, A., Cortés-Barberena, E., Königsberg, M., Arteaga-Silva, M., Rodríguez-Tobón, A., Fuentes-Mascorro, G., León-Galván, M. A. (2016). Reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity during epididymal sperm maturation in *Corynorhinus mexicanus* bats. *Reproductive Biology*, 16:1, 78–86.
- Achikanu, C., Pendekanti, V., Teague, R., y Publicover, S. (2018). Effects of pH manipulation, CatSper stimulation and Ca^{2+} -store mobilization on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and behaviour of human sperm. *Human Reproduction*, 33(10), 1802–1811.
- Álvarez-Guerrero, A., González-Díaz, F., Medrano, A., and Moreno-Mendoza, N. (2016). In vitro capacitation and acrosome reaction in sperm of the phyllostomid bat *Artibeus jamaicensis*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 52(4), 454–465.
- Ardon, F., Markello, R. D., Hu, L., Deutsch, Z. I., Tung, C.-K., Wu, M., and Suarez, S. S. (2016). Dynamics of bovine sperm interaction with epithelium differ between oviductal isthmus and ampulla. *Biology of Reproduction*, 95(4), 90–91.
- Austin, C. R. (1952). The 'capacitation' of the mammalian sperm. *Nature*, 170(4321), 326.
- Babcock, D. F. (1983). Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore. *Journal of Biological Chemistry*, 258(10), 6380–6389.
- Bailey, J. L. (2010). Factors regulating sperm capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(5), 334–348.
- Biggers, J. D., Whitten, W. K., and Whittingham, D. G. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. *The Culture of Mouse Embryos in Vitro*.
- Brown, S. G., Costello, S., Kelly, M. C., Ramalingam, M., Drew, E., Publicover, S. J., and Da Silva, S. M. (2017). Complex CatSper-dependent and independent $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signalling in human spermatozoa induced by follicular fluid. *Human Reproduction*, 32(10), 1995–2006.
- Cai, X., and Clapham, D. E. (2008). Evolutionary genomics reveals lineage-specific

- gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSper and CatSper β . *Plos One*, 3(10), e3569.
- Cai, X., Wang, X., and Clapham, D. E. (2014). Early evolution of the eukaryotic Ca²⁺ signaling machinery: conservation of the CatSper channel complex. *Molecular Biology and Evolution*, 31(10), 2735–2740.
- Cervantes, M. I., Arenas-Ríos, E., Miguel Ángel, L.-G., Ricardo, L.-W., Demetrio, A., and Adolfo, R. (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54(4–5), 196–204.
- Chávez, Julio C., de la Vega-Beltrán, J. L., Escoffier, J., Visconti, P. E., Treviño, C. L., Darszon, A., and Santi, C. M. (2013). Ion Permeabilities in Mouse Sperm Reveal an External Trigger for SLO3-Dependent Hyperpolarization. *PLoS One*, 8(4), 1–13.
- Chávez, Julio C, De la Vega-Beltrán, J. L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L., and Darszon, A. (2018). Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology*, 233(6), 4735–4747.
- Chávez, Julio César, Ferreira, J. J., Butler, A., Beltrán, J. L. D. L. V., Treviño, C. L., Darszon, A., and Santi, C. M. (2014). SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CatSper channels in sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 32266–32275.
- Chung, J.-J., Miki, K., Kim, D., Shim, S.-H., Shi, H. F., Hwang, J. Y., and Clapham, D. E. (2017). CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *Elife*, 6, e23082.
- Crichton, E G, Hinton, B. T., Pallone, T. L., and Hammerstedt, R. H. (1994). Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *American Journal Physiology*, 267(5–2), R1363-70.
- Crichton, Elizabeth G, and Krutzsch, P. H. (2000). *Reproductive biology of bats*. Academic Press.
- Cuasnicú, P. S., Cohen, D. J., Ellerman, D. A., Busso, D., Da Ros, V. G., and Morgenfeld, M. M. (2002). Changes in specific sperm proteins during epididymal

- maturation. In *The epididymis: from molecules to clinical practice* (pp. 389–403). Springer.
- Darszon, A, Nishigaki, T., Beltran, C., and Trevino, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), 1305–1355.
- Darszon, Alberto. (2007). Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *Biotecnología*, 14, 31–33.
- Darszon, Alberto, López-Martínez, P., Acevedo, J. J., Hernández-Cruz, A., and Treviño, C. L. (2006). T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell Calcium*, 40(2), 241–252.
- De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E. O., Wertheimer, E., Treviño, C. L., and Darszon, A. (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44384–44393.
- del Río, M. J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M. E., Moreno, R. D., and Vigil, P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*, 5(4), 368–373.
- Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De la Vega-Beltran, J. L., Hockensmith, J. W., and Visconti, P. E. (2003). Involvement of a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7001–7009.
- Edith, A.-R., Adolfo, R. G., Edith, C.-B., Mina, K., Marcela, A.-S., Ahiezer, R.-T., and Angel, L.-G. M. (2016). Reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity during epididymal sperm maturation in *Corynorhinus mexicanus* bats. *Reproductive Biology*, 16(1), 78–86.
- Escoffier, J., Krapf, D., Navarrete, F., Darszon, A., and Visconti, P. E. (2012). Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *Journal of Cell Science*, 125(2), 473–485.
- Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S., and Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction*, 96(1), 2–12.

- Gervasi, M. G., and Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204–218.
- Gervasi, M G, and Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204–218.
- Gervasi, Maria Gracia, and Visconti, P. E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Molecular Reproduction and Development*, 83(10), 860–874.
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), 1–17.
- Gu, Y., Kirkman-Brown, J. C., Korchev, Y., Barratt, C. L. R., and Publicover, S. J. (2004). Multi-state, 4-aminopyridine-sensitive ion channels in human spermatozoa. *Developmental Biology*, 274(2), 308–317.
- Hernández- Rodríguez, J. (2016). Evaluación de la maduración espermática epididimaria de la rata Wistar expuesta a cadmio. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Hernández-González, E. O., Sosnik, J., Edwards, J., Acevedo, J. J., Mendoza-Lujambio, I., López-González, I., and Visconti, P. E. (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5623–5633.
- Hirohashi, N., Gerton, G. L., and Buffone, M. G. (2011). Video imaging of the sperm acrosome reaction during in vitro fertilization. *Communicative and Integrative Biology*, 4(4), 471–476.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., and Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4892–4896.
- Jin, S.-K., and Yang, W.-X. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*, 8(2), 3600.

- Kulbacka, J., Choromańska, A., Rossowska, J., Weżgowiec, J., Saczko, J., and Rols, M.-P. (2017). Cell membrane transport mechanisms: Ion channels and electrical properties of cell membranes. In *Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy* (pp. 39–58). Springer.
- Kunz, T. H., and Anthony, E. L. P. (1982). Age Estimation and Post-Natal Growth in the Bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 63(1), 23–32.
- León-Galvan, M. A., Fonseca, T., López-Wilchis, R., and Rosado, A. (1999). Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Canadian Journal of Zoology*, 77(1), 7–12.
- León-Galván, M. A., López-Wilchis, R., Hernández-Pérez, O., Arenas-Ríos, E., and Rosado, A. (2005). Male reproductive cycle of Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *The Southwestern Naturalist*, 50(4), 453–460.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., and Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387–391.
- López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A., and Treviño, C. L. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 20(7), 619–629.
- López-Torres, A. S., González-González, M. E., Mata-Martínez, E., Larrea, F., Treviño, C. L., and Chirinos, M. (2017). Luteinizing hormone modulates intracellular calcium, protein tyrosine phosphorylation and motility during human sperm capacitation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(2), 834–839.
- López-Wilchis, R. (1989). *Biología de Plecotus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae) en el estado de Tlaxcala, México. Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.
- Mata-Martínez, E., Darszon, A., and Treviño, C. L. (2018). pH-dependent Ca²⁺ oscillations prevent untimely acrosome reaction in human sperm. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications, 497(1), 146–152.
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., and Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*, 352(6285), 555–559.
- Miller, M. R., Mansell, S. A., Meyers, S. A., and Lishko, P. V. (2015). Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species. *Cell Calcium*, 58(1), 105–113.
- Molina, L. C. P., Gunderson, S., Riley, J., Lybaert, P., Borrego-Alvarez, A., Jungheim, E. S., and Santi, C. M. (2020). Membrane potential determined by flow cytometry predicts fertilizing ability of human sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 387.
- Molina, L. C. P., Pinto, N. A., Torres, N. I., González-Cota, A. L., Luque, G. M., Balestrini, P. A., and Treviño, C. L. (2018). CFTR/ENaC-dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC. *Journal of Biological Chemistry*, 293(25), 9924–9936.
- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J., and Clapham, D. E. (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *The International Journal of Developmental Biology*, 52, 607.
- Ng, K. Y. B., Mingels, R., Morgan, H., Macklon, N., and Cheong, Y. (2018). In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 24(1), 15–34.
- Okabe, M. (2016). The acrosome reaction: a historical perspective. In *Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization* (pp. 1–13). Springer.
- Organization, W. H. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5^a, edition. 286.
- Orta, G., Vega-Beltran, J. L. de la, Martín-Hidalgo, D., Santi, C. M., Visconti, P. E., and Darszon, A. (2018). CatSper channels are regulated by protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16830–16841.

- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., and Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 5.
- Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., and Buffone, M. G. (2018). Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 72.
- Rahban, R., and Nef, S. (2020). CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 110951.
- Rennhack, A., Schiffer, C., Brenker, C., Fridman, D., Nitao, E. T., Cheng, Y., and Berger, T. K. (2018). A novel cross-species inhibitor to study the function of CatSper Ca^{2+} channels in sperm. *British Journal of Pharmacology*, 175(15), 3144–3161.
- Ritagliati, C., Graf, C. B., Stival, C., and Krapf, D. (2018). Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mechanisms of Development*, 154, 33–43.
- Robaire, B., Hinton, B. T., and Orgebin-Crist, M.-C. (2006). The epididymis. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* (Third Edition). Elsevier. 1071–1148.
- Rodríguez-Tobón, A. (2016). Estudio de la maduración de espermatozoides epididimarios del murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rodríguez-Tobón, A., Fierro, R., León-Galván, M. A., Rosado, A., Cortés-Barberena, E., and Arenas-Ríos, E. (2016a). Tyrosine phosphorylation as evidence of epididymal cauda participation in the sperm maturation process of *Corynorhinus mexicanus* bat. *Acta Zoologica*, 97(3), 310–318.
- Romarowski, A., Sánchez-Cárdenas, C., Ramírez-Gómez, H. V, Puga Molina, L. del C., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A., and Buffone, M. G. (2016). A specific transitory increase in intracellular calcium induced by progesterone promotes acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Biology of Reproduction*, 94(3), 61–63.
- Romero, F., and Nishigaki, T. (2019). Comparative genomic analysis suggests that the sperm-specific sodium/proton exchanger and soluble adenylyl cyclase are key regulators of CatSper among the Metazoa. *Zoological Letters*, 5(1), 25.
- Santi, C. M., Martínez-Lopez, P., de la Vega-Beltrán, J. L., Butler, A., Alisio, A.,

- Darszon, A., and Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett*, 584(5), 1041–1046.
- Shi, Y. L., Bai, J.-P., and Wang, W.-P. (2003). Ion-channels in human sperm membrane and contraceptive mechanisms of male antifertility compounds derived from Chinese traditional medicine. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(1), 22–30.
- Shukla, K. K., Mahdi, A. A., and Rajender, S. (2012). Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. *Journal of Andrology*, 33(5), 777–788.
- Singh, A. P., and Rajender, S. (2015). CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 30(1), 28–38.
- Stival, C., Molina, L. del C. P., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., and Krapf, D. (2016). Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. In *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization* (pp. 93–106). Springer.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382–386.
- Suarez, S. S., and Ho, H. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(2), 119–124.
- Sullivan, R., and Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, 146(1), R21-35.
- Sullivan, Robert, and Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 22(5), 574–587.
- Tobón, A. R., Arena-Ríos, E., and León-Galván, M. A. (2010). El almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, adaptación que permite sincronizar el periodo de apareamientos en murciélagos. *ContactoS*, 78, 58–64.
- Treviño, C. L., Felix, R., Castellano, L. E., Gutiérrez, C., Rodríguez, D., Pacheco, J., and Hernández-Cruz, A. (2004). Expression and differential cell distribution of

low-threshold Ca²⁺ channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Letters*, 563(1–3), 87–92.

Vicens, A., Andrade-López, K., Cortez, D., Gutiérrez, R. M., and Treviño, C. L. (2017). Premammalian origin of the sperm-specific Slo3 channel. *FEBS Open Bio*, 7(3), 382–390.

Wang, Z., Shi, Q.-X., Wang, Y.-N., Wang, Y.-L., and Zhang, S.-Y. (2008). Epididymal sperm storage in Rickett's big-footed bat (*Myotis ricketti*). *Acta Chiropterologica*, 10(1), 161–167.

Yanagimachi, R., and Chang, M. C. (1963). Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature*, 200(4903), 281–282.

Zhou, Y., Zheng, M., Shi, Q., Zhang, L., Zhen, W., Chen, W., and Zhang, Y. (2008). An epididymis-specific secretory protein HongrES1 critically regulates sperm capacitation and male fertility. *Plos One*, 3(12), e4106.