



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00091

Matrícula: 2183801945

EVIDENCIAS DE MADURACIÓN
ESPERMÁTICA DURANTE EL
ALMACENAMIENTO PROLONGADO
EN HEMBRAS DEL 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 15 del mes de febrero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. EDITH ARENAS RIOS
DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA
DR. TAKUYA NISHIGAKI
DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

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


MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL


DE: IXCHEL ROJAS MARTINEZ

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

APROBAR

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


IXCHEL ROJAS MARTINEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS


DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA


DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL


DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA

VOCAL


DR. TAKUYA NISHIGAKI

SECRETARIO


DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe Biól. Ixchel Rojas Martínez, 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: **“Evidencias de maduración espermática durante el almacenamiento prolongado en hembras del murciélago *Corynorhinus Mexicanus*”**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante la comisión de la maestría en Biología de la Reproducción Animal para la obtención del grado de Maestra 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 12 de febrero del 2021.

Atentamente


Rojas Martínez Ixchel

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

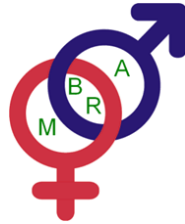
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL



**EVIDENCIAS DE MADURACIÓN ESPERMÁTICA DURANTE EL
ALMACENAMIENTO PROLONGADO EN HEMBRAS DEL MURCIÉLAGO
*CORYNORHINUS MEXICANUS***

TESIS

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

PRESENTA

BIÓL. IXCHEL ROJAS MARTÍNEZ

DIRECTOR

DR. RICARDO LÓPEZ WILCHIS

ASESORES

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

DR. AHIEZER RODRÍGUEZ TOBÓN

CDMX a 15 de febrero 2021

COMITÉ TUTORIAL



Dr. López Wilchis Ricardo

rlw@xanum.uam.mx

UAM-Iztapalapa

Laboratorio Biología y Ecología de mamíferos



Dra. Arenas Ríos Edith

editharenas2000@yahoo.com.mx

UAM-Iztapalapa

Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del espermatozoide



Dr. Rodríguez Tobón Ahiezer

ahiezer.rod@gmail.com

UAM-Iztapalapa

Laboratorio Biología y Ecología de mamíferos

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Arenas Ríos Edith

editharenas2000@yahoo.com.mx

UAM-Iztapalapa

Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del espermatozoide

Dr. Rodríguez Tobón Ahiezer

ahiezer.rod@gmail.com

UAM-Iztapalapa

Laboratorio Biología y Ecología de mamíferos

Dr. Takuya Nishigaki

takuya@ibt.unam.mx

IBT, UNAM

Consorcio de Fisiología Molecular de Espermatozoide
y Biosensor fluorescente

Dr. Julio César Chávez Zamora

julio.chavez@mail.ibt.unam.mx

IBT, UNAM

Consorcio de Fisiología Molecular de Espermatozoide y
Biosensor fluorescente

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Con el número de registro ante CONACYT: 003797.

La alumna Ixchel Rojas Martínez recibió apoyo del CONACyT, mediante el otorgamiento de una beca económica durante todo el tiempo de duración de los estudios en el posgrado. Número de registro CVU: 925698

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes aprobaron la tesis titulada “**Evidencias de maduración espermática durante el almacenamiento prolongado en hembras del murciélago *Corynorhinus mexicanus***” con fecha 15 de febrero de 2021.

Presidenta



DRA. EDITH ARENAS RIOS

Secretario



DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

Vocal



DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA

Vocal



DR. TAKUYA NISHIGAKI

“Es a fuerza de observación y reflexión que uno encuentra un camino”

-Claude Monet

DEDICATORIA

Esta tesis fue solo posible gracias a que todo el tiempo trabaje bajo el ala de tres grandes investigadores: el Dr. Ricardo López Wilchis, la persona con la que aprendí a mirar a los murciélagos de una nueva forma, cuya guía fue crucial en el camino que comenzó desde la licenciatura y que continúa en el posgrado, prestando su apoyo incondicional, su tiempo y consejo; la Dra. Edith Arenas Ríos una mujer extraordinaria que me abrió las puertas de su laboratorio, poniendo a mi disposición todo su conocimiento, siendo una docente excepcionalmente paciente que me ayudó a cultivarme de muchas maneras y un apoyo constante e incansable, durante todo este posgrado; y el Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón, quien estuvo pendiente del proyecto, asegurándose que en todo momento aprendiera cosas nuevas y le sacara provecho a mi estancia en el posgrado. A los tres les doy infinitas gracias, por el compromiso que tuvieron tanto conmigo como con el proyecto, ayudándome a superar todos y cada uno de los retos con los que me tope durante estos dos años.

Y si bien, la guía de los doctores fue crucial para que este proyecto tuviera forma, también conté con el apoyo de diversas personas que me enriquecieron e hicieron más ameno mi trayecto. A los primeros que voy a mencionar son los docentes que durante el primer año de mi maestría me enseñaron cosas completamente nuevas con pasión y paciencia, muchas gracias a todos y cada uno de ellos. Después están mis compañeros de la generación 2018-2020 de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, con los que compartí un sinnúmero de momentos, desde los más felices, hasta los más angustiosos y tristes, gracias, chicos por siempre regalarme una sonrisa, darme un consejo o compartir sus conocimientos conmigo. Luego están mis compañeros de laboratorio con los que siempre fue ameno tratar y trabajar.

Tres personas que se merecen mención honorífica, son la bióloga Angie Campos Rentería y los Maestros en Biología de la Reproducción Animal José Edwin Mendoza Sánchez y Gihovani Samano Barbosa, quienes me mostraron en todo momento la amistad más incondicional, chicos con ustedes pase de todo,

agradezco que hayan sido ustedes con los que me tocara vivir este periodo tan extraordinario de mi vida, gracias por enseñarme, escucharme, apoyarme y mostrarme como se hacen las cosas con pasión, sé que tendrán éxito en todo lo que se propongan en esta vida.

Otras personas a las que también les agradezco de todo corazón por ser y estar, es a mi familia. Por una parte, Sacni, Karen, Ana, Sam, Moni, ustedes siempre estuvieron para mí en los momentos más críticos, sirviendo de faro cuando más perdida me sentía, sin juzgarme se mantuvieron a mi lado sin dudarlo, siempre confiando más en mí que yo misma, se los agradezco de todo corazón, chicas esta tesis es tan suya como mía, las adoro. Y por otra, papá, mamá, les agradezco no darse por vencidos conmigo, me dieron todas las herramientas que necesite para superar este nuevo reto, fueron mis compañeros de desvelo, conociendo nuevas facetas de mí, algunas las aceptaron y otras no tanto, agradezco que siempre tuvieran un consejo, una pregunta o un regaño para mí, nunca me voy a cansar de demostrarles hasta donde puedo llegar con lo que ustedes me dan, los amo. Para terminar, le doy las gracias a la persona que me convenció de entrar a esta maestría, esta tesis fue posible gracias a ti hermano, te agradezco con el alma que me convencieras de tomar este camino, que me tuvieras la paciencia y el cariño para decir las palabras adecuadas en el momento adecuado, vamos por nuevos retos Coach.

También debo agradecer a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, mi alma mater, institución que me prestó todas las facilidades logísticas para la realización de este proyecto y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico, sin el cual hubiera sido difícil completar este proyecto

RESUMEN

La maduración espermática es un proceso que le permite a los espermatozoides de mamíferos alcanzar el potencial fertilizante, el cual ocurre desde las gónadas masculinas hasta el tracto genital de las hembras. En algunas especies de quirópteros como *Corynorhinus mexicanus*, presentan un largo periodo de almacenamiento, el cual se ha considerado desde hace algunas décadas puede influir en el proceso de maduración de los espermatozoides en esta especie.

El almacenamiento espermático es una estrategia ampliamente utilizada por el grupo de los quirópteros., Los sitios de almacenamiento que se han reportado son la cauda epididimaria en machos y la región útero-tubaria en la hembra. Debido a que el gameto masculino se debe mantener viable hasta el momento de la copula, su fisiología se ve modificada durante su trayecto hasta el encuentro con su contraparte femenina, el ovocito. En *C. mexicanus*, se presentan dos periodos de almacenamiento bien establecidos, el primero en la cauda epididimaria donde los espermatozoides pasan hasta 6 meses y un segundo periodo en la unión útero tubaria en la hembra.

Se ha reportado que los espermatozoides de *C. mexicanus* tienen un proceso de maduración epididimaria lenta, ya que existe un aumento gradual del porcentaje de gametos maduros en relación con el tiempo que pasan almacenados. Algunos indicadores usados para medir este parámetro fueron: el porcentaje de espermatozoides capacitados, como indicador indirecto de maduración, en conjunto con indicadores fisiológicos que participan durante este proceso de maduración en el tracto reproductor femenino como: la fosforilación de tirosinas y su respuesta al pH intracelular. Sin embargo, no existe un estudio en el que se demuestre si el tiempo de almacenamiento influye sobre la fisiología espermática, específicamente durante el tránsito del espermatozoide de la región utero-tubaria hasta su encuentro con el ovocito. Es por lo anterior que, el objetivo de este trabajo fue determinar si los indicadores de maduración como el porcentaje de espermatozoides capacitados, la externalización de fosfatidilserina (PS), las concentraciones intracelulares de calcio, la fosforilación de tirosinas y su

respuesta al pH intracelular, incrementan en el periodo de almacenamiento en el tracto reproductivo de la hembra, como indicativo del estado de maduración de las células.

Se colectaron y se extrajeron los espermatozoides de 9 hembras adultas durante los meses de almacenamiento (noviembre y diciembre). Las células fueron sometidas a capacitación *in vitro* (37°C, 5% CO₂) para posteriormente teñirlos con Clorotetraciclina (CTC) y contabilizar los patrones de tinción en dos diferentes pH. Posteriormente, se determinó la externalización de fosfatidilserina (PS) empleando Anexina-V. Se utilizó FLUO 3 AM para determinar la concentración de calcio intracelular. Finalmente, para determinar la cantidad de proteínas que presentan fosforilación de tirosinas se empleó pY-20.

Se observó un aumento del 3% de espermatozoides capacitados de noviembre a diciembre, que además se encuentra asociado a un aumento en el pH en el medio de capacitación y a un incremento en la marca de FLUO 3 AM de noviembre a diciembre y en el porcentaje de los espermatozoides marcados por Anexina-V y la marca en sí, en la membrana de los espermatozoides. Parámetros que, en conjunto, podrían estar favoreciendo la fosforilación de tirosinas, que se eleva 1.7 de noviembre a diciembre. En conjunto, estos indicadores sugieren la existencia de un evento que posterga la maduración de las células previo a la capacitación espermática durante el periodo de almacenamiento en el tracto reproductor femenino.

ABSTRACT

Sperm maturation is a process that allows mammalian sperm to reach fertilizing potential, which occurs from the male gonads to the female genital tract. In some species of Chiroptera such as *Corynorhinus mexicanus*, they have a long storage period, which has been considered for some decades to influence the sperm maturation process in this species.

Sperm storage is a strategy widely used by the group of Chiroptera, the storage sites that have been reported are the cauda epididymis in males and the utero-tubal region in the female. Due that male gamete must remain viable until copulation, its physiology is modified during its journey to the encounter with its female counterpart, the oocyte. In *C. mexicanus*, there are two well-established storage periods, the first in the cauda epididymis where the sperm remains up to 6 months and a second period in the utero-tubal junction in the female.

It has been reported that *C. mexicanus* spermatozoa undergo slow epididymal maturation process, since there is a gradual increase in the percentage of mature gametes in relation to the time they were stored. Some indicators used to measure this parameter were: the percentage of capacitated spermatozoa, as an indirect maturation indicator, together with physiological indicators that participate during this maturation process in the female reproductive tract such as: tyrosine phosphorylation and its response to intracellular pH. However, there is no study showing whether the storage time influences sperm physiology, specifically during the transit of sperm from the utero-tubal junction to meet the oocyte. Therefore, the aim of this work was to determine if maturation indicators such as percentage of capacitated spermatozoa, externalization of phosphatidylserine (PS), intracellular calcium concentrations, tyrosine phosphorylation and its response to intracellular pH, increase in the storage period in the female reproductive tract, as an indication of the state of maturation of cells.

Sperm were collected and extracted from 9 adult females during the months of storage (November and December). The cells were subjected to in vitro capacitation (37°C, 5% CO₂) and then stained with Chlorotetracycline (CTC) and

counted the staining patterns at two different pHs. Subsequently, the externalization of phosphatidylserine (PS) was determined using Annexin-V. FLUO 3 AM was used to determine intracellular calcium concentration. Finally, pY-20 was used to determine the amount of proteins with tyrosine phosphorylation. An increase of 4% of capacitated spermatozoa was observed from November to December, which is also associated with an increase in the pH of the capacitation medium and an increase in $[Ca^{2+}]_i$ from November (IF: 952.45) to December (IF: 18939.2656). These parameters, together, could be favoring the phosphorylation of tyrosines, which rises from November (IF: 11205.04) to December (IF: 18449.16). Together, these indicators suggest the existence of an event that delays the maturation of cells prior to sperm capacitation during the storage period in the female reproductive tract.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1 introducción..... | 14 |
| 1.1 El Espermatozoide..... | 14 |
| 1.1.1 Maduración espermática..... | 14 |
| 1.1.2 Maduración espermática epididimaria | 17 |
| 1.1.3 El almacenamiento en la cauda epididimaria..... | 19 |
| 1.1.4 Capacitación..... | 20 |
| 1.1.5 Hiperactivación | 24 |
| 1.2 Almacenamiento espermático en hembras | 26 |
| 1.2.1 Almacenamiento prolongado de espermatozoides | 27 |
| 2.Antecedentes..... | 28 |
| 2.1 Maduración y almacenamiento espermático en el murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i> | 28 |
| 3 Justificación..... | 32 |
| 4Pregunta de investigación..... | 34 |
| 5Hipótesis | 34 |
| 6. Objetivos..... | 34 |
| 6.1 General..... | 34 |
| 6.2 Específicos..... | 34 |
| 7.Material y métodos..... | 35 |
| 8. Resultados | 40 |
| 8.1 Viabilidad y concentración espermática..... | 40 |
| 8.2 Capacitación..... | 41 |
| 8.3 Calcio intracelular | 42 |
| 8.4 Externalización de fosfatidilserina | 43 |
| 8.5 Fosforilación de tirosinas..... | 44 |
| 9. Discusión | 45 |
| 10. Conclusión | 56 |
| 11. Bibliografía | 56 |

1 Introducción

1.1 El Espermatozoide

El espermatozoide es una célula sumamente especializada cuyo único objetivo es transportar el material genético del gameto masculino al gameto femenino y fertilizarlo. Morfológicamente, esta célula, se puede dividir en dos regiones: cabeza y flagelo. En el flagelo se pueden distinguir: la pieza media, pieza principal y pieza final (Sutovsky, 2006). El potencial fértil de los espermatozoides se adquiere de manera diferente entre los vertebrados, en el caso de los peces cuando son liberados al agua cuentan con un breve periodo de activación (limitado a pocos segundos en varias especies) expresada en movilidad y velocidad de desplazamiento progresivo para lograr la fertilización. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde se requiere completar su maduración para adquirir su potencial fértil (Robaire, 2006 #155; Achikanu, 2018 #5; De Jonge, 2006 #110; Martin-Hidalgo, 2018 #64; Sutovsky, 2006 #106).

1.1.1 Maduración espermática

Se ha propuesto que la maduración de los espermatozoides en mamíferos, puede estar dividida en tres grandes eventos: a) Espermiogénesis (testículo); b) Maduración epididimaria (Rodríguez-Tobón, Arenas-Ríos, & León-Galván, 2010) y; c) Capacitación espermática (tracto reproductor femenino) (Acevedo & Maya, 2017; Bedford, 2004; Bernecic, Gadella, Leahy, & de Graaf, 2019; Buffone, 2016; Cervantes et al., 2008; Cooper & Yeung, 2006; Crichton, 2000; Cuasnicú et al., 2002; Dacheux & Dacheux, 2014; Darszon, 2008; Gervasi & Visconti, 2017)

En los mamíferos, los espermatozoides son producidos en los testículos mediante un proceso conocido como espermatogénesis (Fig. 1), que ocurre al interior de los túbulos seminíferos, a partir de las células germinales conocidas como espermatogonias mediante mecanismos de mitosis y meiosis divididas en cuatro etapas (De Jonge & Barratt, 2006):

1. Fase de proliferación. En esta, ocurre la multiplicación de las células germinales por medio de mitosis y el resultado son las espermatogonias (2n).

2. Fase de crecimiento. Las espermatogonias de tipo B aumentan de tamaño y se transforman en espermatocitos de primer orden, que migran al compartimiento adluminal del túbulo seminífero antes de comenzar la primera división meiótica mientras siguen siendo diploides.
3. Fase de maduración. Cada espermatocito sufre su primera división meiótica, lo cual da como resultado dos espermatocitos de segundo orden (n). Posteriormente, estas células sufren una segunda división meiótica a partir de la cual surgen dos espermátidas (n).

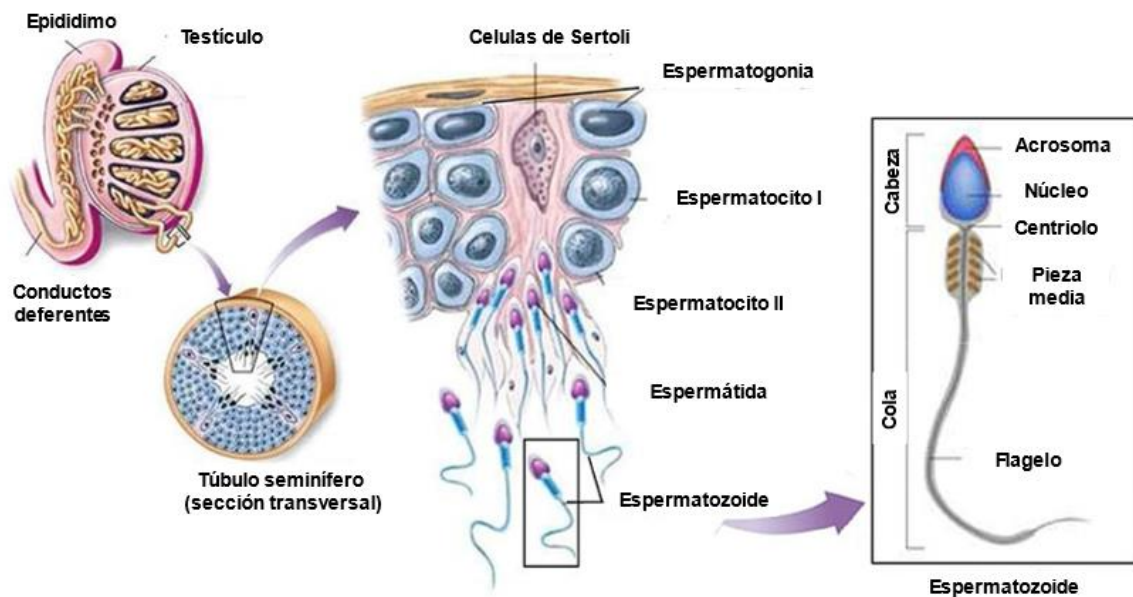


Fig. 1 Representación esquemática de los estadios de la espermatogénesis. Tomado y modificado de Allais-Bonnet and Pailhoux (2014)

Estas células avanzan desde la lámina basal del túbulo seminífero hasta la luz, modificando su morfología bajo una serie de cambios conocidos como espermiogénesis (Fig. 2), los cuales involucran:

- **Condensación del núcleo:** Se hace pequeño, denso y con forma aplastada. El ADN se compacta por la acción de unas proteínas denominadas protaminas.

- **Formación del acrosoma:** Se posiciona en el extremo apical, y aparece rodeado por dos membranas, una externa y otra interna. El acrosoma es un lisosoma especializado que contiene principalmente hialuronidasa
- **Formación del flagelo:** Se desarrolla a partir del centriolo distal y constituye un cilindro de 9 microtúbulos dobles que rodea dos únicos centrales (estructura 9+2). Durante la rotación del núcleo se dispone en la base de la cabeza.
- **Reducción del citoplasma:** El citoplasma de la espermátida es fagocitado por las células de Sertoli. Sin embargo, una pequeña cantidad puede permanecer unido al espermatozoide después de ser liberado de los túbulos (Phillips, 2012).

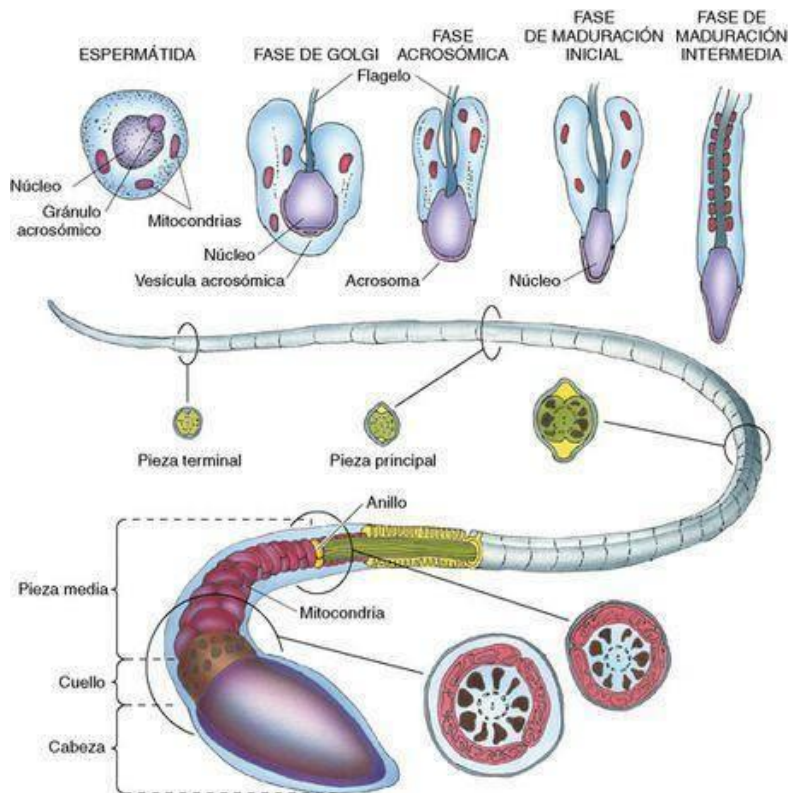


Fig. 2 Representación esquemática de la espermiogénesis, donde se pueden apreciar las fases de este proceso. Esquema tomado de B. M. Carlson (2019).

En vertebrados superiores como los mamíferos, los espermatozoides que se encuentran en la luz de los túbulos seminíferos ya son morfológicamente iguales a los que fertilizan al ovocito, pero estas células aún no han adquirido su capacidad fertilizante (Robaire, Hinton, & Orgebin-Crist, 2006). Por lo cual, deben pasar por el epidídimo, órgano en el que los gametos masculinos llevarán a cabo un proceso de maduración que les permitirá fertilizar al ovocito (Cooper & Yeung, 2006; Cuasnicú et al., 2002; Dacheux & Dacheux, 2014)

Una vez que los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo, aún no han adquirido la capacidad para fertilizar al ovocito, para lo cual, los gametos viajan hacia el epidídimo a través de los conductos eferentes en donde continuarán su maduración.

1.1.2 Maduración espermática epididimaria

El epidídimo, es un órgano andrógono dependiente, encargado del transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides. Anatómicamente se divide en 4 regiones principales: segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*. En la mayoría de los mamíferos, la maduración espermática se lleva a cabo entre el *caput* y *corpus*, siendo la *cauda* la región de almacenamiento de los espermatozoides. Ambos procesos (maduración y almacenamiento) son de duración relativamente corta, de 8 a 11 días dependiendo de la especie y los espermatozoides que son almacenados tienen una capacidad fertilizante superior al 40% (Cooper, 2011; Cooper & Yeung, 2006).

Conforme los espermatozoides se desplazan de la región cefálica a la caudal del epidídimo, presentarán una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que secuencialmente modifican al espermatozoide, proceso conocido como maduración espermática epididimaria (Cooper, 2011; Robaire, Hinton, & Orgebin-Crist, 2006; Sullivan, Frenette, & Girouard, 2007; Yeung et al., 1996). Entre los cambios mencionados se encuentra: el aumento en la carga negativa de la membrana plasmática, disminución del diámetro de las mitocondrias e incremento de la capacidad del movimiento progresivo, pérdida de la gota citoplasmática,

cambios en el proteoma del espermatozoide (Cuasnicú et al., 2002; Gervasi & Visconti, 2016; Sullivan & Saez, 2013), reestructuración o remodelación de la forma del acrosoma y la estabilización de la membrana por parte del colesterol. Lo anterior, le conferirá al espermatozoide, el potencial para capacitarse y para llevar a cabo la reacción acrosomal, y finalmente fertilizar el ovocito (Cuasnicú et al., 2002; A. Darszon et al., 2006; Gervasi & Visconti, 2017; Robaire et al., 2006; Saez, Frenette, & Sullivan, 2003; Shum, Ruan, Da Silva, & Breton, 2011).

Los cambios que le ocurren a los espermatozoides en el epidídimo se deben a que en cada región, las células epiteliales expresan diferentes genes y sintetizan diversas proteínas que, junto con otras sustancias (aminoácidos, iones, fosfatos, etc.) son liberadas al lumen y en conjunto con la absorción del líquido epididimario se crean distintos gradientes de concentración, que favorecen las características micro ambientales particulares de cada región epididimaria, y que al entrar en contacto directo con este microambiente luminal específico se favorecerán las modificaciones necesarias para su maduración. (Crabo, 1965; Dacheux & Dacheux, 2014; Levine & Marsh, 1971; Reynolds, 1948).

En el caso de las proteínas presentes en el fluido luminal del epidídimo, se ha reportado un amplio repertorio, en el que se incluye: enzimas, factores de crecimiento, lipoproteínas, metaloproteínas, proteínas encargadas de la unión de gametos, transportadores, etc. (Cooper & Yeung, 2006; Robaire et al., 2006). La concentración de estas moléculas aumenta de manera progresiva desde los túbulos seminíferos (aproximadamente de 6 a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), hacia el *rete testis* (aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), *caput* y *cauda* del epidídimo (aproximadamente 25 a 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se han reportado que los solutos orgánicos que se encuentran en el fluido epididimario son: glutamato, taurina, L-carnitina, mioinositol, glicerilfosforilcolina, fosforilcolina, ácidos siálicos y muchos otros aminoácidos, que al igual que las proteínas, presentan un aumento progresivo desde los túbulos seminíferos (10 - 20 mM), *caput* (100 - 150 mM) hasta la *cauda* (200 mM) (Cooper & Yeung, 2006; Robaire et al., 2006).

En el caso de los iones, se ha reportado la presencia de potasio, fósforo, calcio, magnesio, sodio y cloro. A diferencia de las proteínas o solutos orgánicos, el ambiente iónico está dividido en dos: los iones como el potasio y el fósforo, que aumentan en concentración conforme el espermatozoide avanza del *caput* a la *cauda* y el caso de los iones que disminuyen de manera progresiva como el calcio, magnesio, sodio y cloro (Robaire et al., 2006). Este cambio en las concentraciones permite que el pH luminal también disminuya progresivamente desde 7.3 en los túbulos seminíferos hasta 6.5 en la *cauda*, impidiendo de esta manera, la movilidad espermática, ya que la acidificación del fluido luminal mantiene quiescentes a los espermatozoides hasta que estos maduran (Cooper & Yeung, 2006; Robaire et al., 2006).

En particular, el Ca^{2+} es un segundo mensajero que participa en la regulación de varios procesos fisiológicos del espermatozoide, como la capacitación, la movilidad y la reacción acrosomal. El Ca^{2+} también favorece la movilidad a través de su papel como segundo mensajero, sobre la dineína ATPasa, localizada en el axonema del flagelo. Es por ello que, las concentraciones de calcio deben mantenerse progresivamente bajas para evitar la hiperactivación del flagelo (Crabo, 1965; Levine & Marsh, 1971; Sullivan et al., 2007; Freitas, Vijayaraghavan, & Fardilha, 2017;), cuando los gametos son almacenados en la cauda epididimaria

1.1.3 El almacenamiento en la cauda epididimaria

Una vez que el proceso de maduración epididimaria concluye, los gametos maduros se almacenan en la cauda del epidídimo por un periodo corto de tiempo en la generalidad de los mamíferos. No obstante, la reproducción de mamíferos es tan diversa como el grupo mismo y debido a que este proceso reproductivo responde al ambiente en donde estos se desarrollan, se genera un gran abanico de estrategias que les permiten hacer frente a las condiciones ambientales durante el periodo reproductivo (Famoso, Hopkins, & Davis, 2018; Gaisler, 1989; P. A. Racey & Entwistle, 2000; Weir & Rowlands, 1973).

Una de las estrategias reproductivas, que diversos ordenes de quirópteros han adoptado, es el almacenamiento de gametos, que consiste en mantener a los gametos masculinos por largos periodos de tiempo (Birkhead & Møller, 1993; Crichton, 2000; Jones & Murdoch, 1996). Para mantenerse viables hasta que la ovulación ocurra, los espermatozoides deben adecuar diferentes procesos fisiológicos para que su vida fértil se prolongue, algunos de estos procesos son los de maduración espermática (Krishna & Roy, 2017; Lee, 2018, 2020).

En la mayoría de mamíferos, al ingresar a la cauda epididimaria los espermatozoides ya se consideran completamente maduros y listos para fertilizar al ovocito, aquí se acumulan durante un periodo corto de tiempo (dependiendo la especie) hasta que alcanzan la cantidad específica de espermatozoides que se observan en un eyaculado (Hafez & Hafez, 2007). Estas células permanecen quiescentes y con su capacidad fecundante intacta hasta que son inseminados en el tracto reproductor femenino dando inicio al proceso de capacitación en la mayoría de mamíferos (Cooper & Yeung, 2006).

1.1.4 Capacitación

Una vez que los espermatozoides son inseminados en el tracto reproductor femenino a nivel de la vagina o útero, se llevará a cabo el último proceso de maduración (la capacitación espermática), con ayuda de los componentes del nuevo ambiente. Este proceso, combina diversos cambios fisiológicos y bioquímicos, necesarios para conferir al espermatozoide su capacidad fertilizante. Entre estos cambios destacan:

a) Activación de canales iónicos que intervienen en los mecanismos de transducción de señales como el flujo de Ca^{+2} , que interviene en la síntesis de Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPC), induciendo la movilidad hiperactivada. Otros eventos en los que se ve involucrado el calcio son la reacción acrosomal y en el proceso de fusión de las membranas en el espermatozoide.

b) Cambio del metabolismo energético que conduce a la desestabilización de la membrana plasmática en la región acrosómica y la hiperactivación del movimiento flagelar.

c) Modificación de las proteínas y los lípidos de membrana, que permiten al espermatozoide ser capaz de unirse a la zona pelúcida y que se lleve a cabo la reacción acrosomal (Mata-Martinez, Darszon, & Trevino, 2018).

Estos cambios exigen la regulación precisa de factores iónicos, metabólicos y enzimáticos, que permiten los cambios específicos en respuesta al ambiente para que la fertilización ocurra, por lo que la comunicación entre el gameto y el ambiente es de vital importancia.

En el año 2017, De Jonge describió que en el caso particular de los espermatozoides de humano depositados en la vagina, migran del plasma seminal enriquecido en esteroides que le ayudan a estabilizar su membrana, al ambiente ácido de la vagina, y al entrar en contacto con el moco cervical, propician la infiltración de leucocitos que eliminan parte de la población de espermatozoides que ingresa al tracto reproductor femenino (De Jonge & Barratt, 2006; Jonge, 2017), este proceso se ve complementado por la eliminación que ocurre cuando las especies reactivas de oxígeno (ERO), producidas por las mitocondrias del mismo espermatozoide y por las células del ambiente del tracto genital femenino, provocando cambios adicionales y necesarios, que promueven la fertilización (Robert J Aitken, 2017; Edith Arenas-Ríos et al., 2014). De la membrana plasmática de los espermatozoides se remueven parte de las partículas que adquirieron durante su paso por el epidídimo (factores discapacitantes, como mucopolisacáridos) y los esteroides, por elementos ultraestructurales del moco cervical (Gadella & Visconti, 2006; Jonge, 2017).

Otro de los cambios ocurridos durante la capacitación, producto del aumento en la fluidez de la membrana plasmática por la salida del colesterol, es una alteración en la distribución normal de los fosfolípidos de la bicapa, resultando en la pérdida de la estructura asimétrica de la membrana. El principal indicador de esta pérdida de estructura es la externalización de amino fosfolípidos que se encuentran en la

cara interna de la bicapa, como la fosfatidilserina que si bien no se encuentra en grandes porciones, se ha descrito que casi el 100% de este lípido se encuentra en la cara interna (R. J. Aitken, Baker, & Nixon, 2015), este aumento en el desorden de los fosfolípidos y una pérdida en la estructura asimétrica, así como el aumento en la fluidez por la salida del colesterol, promueven que distintas proteínas que se encuentran en balsas lipídicas, se movilicen a su posición final (Mayren-Mendoza et al., 2012) Estos cambios generan: a) incremento en la permeabilidad de iones como el calcio (Ca^{2+}), debido a la activación de diversos canales transportadores y; b) la expresión de receptores y la unión de ligandos estimuladores, tales como la proteína de unión al ácido siálico (Álvarez-Guerrero, González-Díaz, Medrano, & Moreno-Mendoza, 2016; Bae et al., 2020; Martin-Hidalgo et al., 2018; Wu et al., 2019; Zhou et al., 2015).

Tanto el incremento en la permeabilidad de iones como el calcio (Ca^{2+}) y la expresión de receptores y la unión de ligandos estimuladores, ocurren durante el avance de los gametos por el oviducto ipsilateral al folículo ovulatorio, hacia la región del ampulla, ya que los espermatozoides son guiados por quimio atrayentes como el péptido natriurético atrial (PNA), secretado por el complejo cumulus-ovocito (COC), hacia el sitio de fertilización. La progesterona, adyacente y absorbida por el cumulus, inicia flujos de Ca^{2+} aumentando la concentración de este ion al interior de la célula a niveles que permitirán la reacción acrosomal estimulada por las glucoproteínas de la zona pelúcida (Fig. 3) (De Jonge & Barratt, 2006; Jonge, 2017).

El avance de los espermatozoides por el oviducto se ve propiciado por el aumento en la fosforilación las proteínas, donde las cinasas fosforilan residuos de serina, treonina o tirosina, induciendo cambios conformacionales mayores y predisponiéndolas para su activación o inactivación, jugando un papel vital en casi todas las funciones celulares, incluyendo: metabolismo, transcripción, progresión del ciclo celular, diferenciación, etc. (De Jonge & Barratt, 2006; Freitas, Vijayaraghavan, & Fardilha, 2017). La fosforilación de tirosinas, es dependiente del

aumento del pH intracelular y del aumento de las ERO, producidas por el mismo espermatozoide (Edith Arenas-Ríos et al., 2014).

Anteriormente se consideraba que la producción de ERO era perjudicial para los espermatozoides, ya que podrían causar oxidación de varios componentes celulares, propiciando su destrucción a través de los radicales libres. Sin embargo, se ha demostrado que estas moléculas juegan un papel fundamental en las modificaciones bioquímicas que ocurren en los espermatozoides durante la maduración y capacitación. Se sabe que, la principal fuente de producción de ERO es la mitocondria, complementada por la acción de la NADPH oxidasa (R. J. Aitken et al., 2015; Edith Arenas-Ríos et al., 2014; Edith Arenas-Ríos et al., 2016; Guthrie & Welch, 2012)

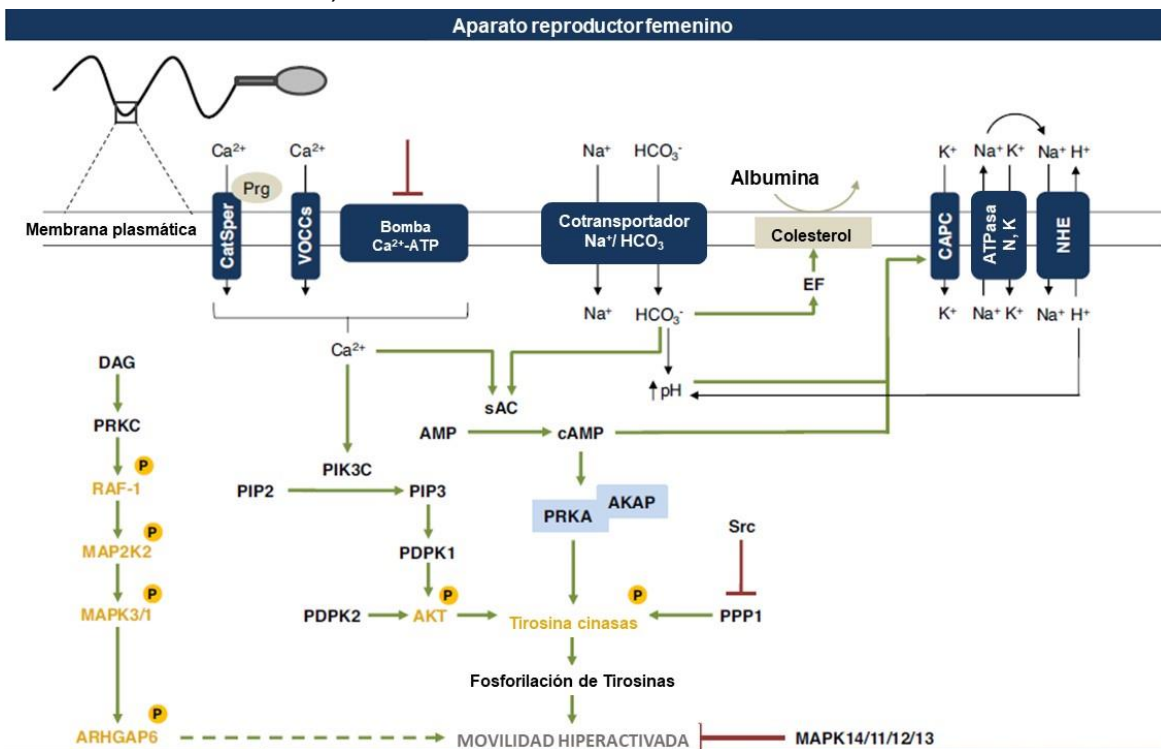


Fig. 3. Representación esquemática de los eventos de señalización necesarios para la movilidad hiperactiva de los espermatozoides en el sistema reproductivo femenino. Esquema adaptado de (Freitas et al., 2017)

En concentraciones bajas y controladas, las que actúan como segundos mensajeros en la iniciación de la movilidad del espermatozoide al incrementar la síntesis de AMPc y en la fosforilación de proteínas, son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$),

el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el óxido nítrico (NO•), (R. J. Aitken et al., 2015; E Arenas-Ríos et al., 2007; Edith Arenas-Ríos et al., 2014; Claudia M Rival et al., 2019).

Los efectos inhibitorios del H₂O₂ en la actividad de las fosfatasa, se ha considerado el mecanismo más probable, e indirectamente responsable de la fosforilación de tirosinas. Ya que, al adicionar H₂O₂ a espermatozoides de hámster, humanos o bovinos conduce a la fosforilación de tirosina y a la maduración del espermatozoide, la capacitación espermática, la reacción acrosomal y la unión del espermatozoide con el ovocito (Arenas-Ríos et al., 2014; Arenas-Ríos et al., 2016; de Lamirande & O'Flaherty, 2008; Guthrie & Welch, 2012).

Las ERO en conjunto con la alcalinización del medio promueven la activación de diversas proteínas, entre ellas, están involucradas en la iniciación de la movilidad del espermatozoide, al incrementar la síntesis de AMPc y la fosforilación de proteínas (Edith Arenas-Ríos et al., 2014). Este cambio conformacional en las proteínas es tomado como un indicador consistente de la capacitación, ya que, se ha demostrado en diversos estudios que, al inhibir la adición de grupos fosfato se bloquean las vías de señalización que inician la capacitación (Breitbart & Finkelstein, 2015; Kwon, Rahman, & Pang, 2014; Naresh & Atreja, 2015).

En el flagelo, la fosforilación de tirosinas tiene un papel importante durante la hiperactivación, que a su vez es necesaria para la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida. Mientras que las proteínas redistribuidas en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación aumentan la fosforilación de tirosina en las regiones del cuello y acrosoma al unirse a la zona pelúcida (Breitbart & Finkelstein, 2015; Kwon et al., 2014; Naresh & Atreja, 2015).

1.1.5 Hiperactivación

Una de las consecuencias directas de la capacitación es la hiperactivación, descrita como una serie de cambios en el movimiento flagelar del espermatozoide (López-Torres et al., 2017). Inicia con el cambio de la movilidad progresiva a una más errática o asimétrica, aumentando el movimiento y flexión del flagelo, lo que

permite el cambio de su trayectoria a irregular/tortuosa y gran amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (Brukman et al., 2019; Darszon, Nishigaki, Beltran, & Treviño, 2011). Este movimiento permitirá al espermatozoide generar la fuerza requerida para la penetración de la capa de células de la granulosa y la inserción inicial en el ovocito. Para lograrlo, los espermatozoides mantienen gradientes iónicos precisos a través de su membrana plasmática, mismos que son regulados por ATPasas dependientes de Na^+/K^+ y Ca^{2+} , así la alteración en la concentración iónica activará enzimas del acrosoma y enzimas relacionadas con los cambios en la movilidad (Brukman et al., 2019; Chavez, Darszon, Trevino, & Nishigaki, 2019; Darszon, 2008; Mata-Martinez, Darszon, & Trevino, 2018).

Para inducir la hiperactivación del flagelo, se requiere Ca^{2+} unido a proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína dentro del flagelo, elevación intracelular del AMPc, aumento del pH intracelular y las ERO que participarán en la fosforilación de proteínas (N. G. Brukman et al., 2019).

En general, estos procesos de maduración se dan de manera secuencial y con periodos de tiempo relativamente cortos entre ellos. Es decir, la culminación del proceso de maduración epididimaria, el periodo de copulas, la capacitación y posterior fertilización del ovocito, ocurren en menos de un mes. No obstante, es importante recalcar que la reproducción de los organismos se ve intervenida por distintos factores, entre ellos las condiciones climáticas y la disponibilidad de alimento, que favorece distintas estrategias reproductivas, que a su vez modifican los procesos fisiológicos en favor de la supervivencia de los progenitores (en especial de la hembra) y de la cría. Entre el gran abanico de estrategias que presentan, en particular en los mamíferos encontramos el almacenamiento espermático que puede existir tanto en el tracto reproductor masculino como en el femenino (Bedford, 2004; Famoso et al., 2018; Hafez & Hafez, 2007; Weir & Rowlands, 1973).

1.2 Almacenamiento espermático en hembras

El único punto de conexión entre toda la diversidad de estrategias reproductivas reportadas en este grupo es que, la reproducción ocurre más de una vez en la vida de un individuo, lo que implica una ciclicidad. La primera etapa de este ciclo es la producción y maduración de los gametos, la segunda es su almacenamiento y envío al sitio de fertilización y finalmente la unión de los gametos de ambos sexos (Cooper & Yeung, 2006; Crichton, 2000; De Jonge & Barratt, 2006). Aunque esto ocurre en todos los mamíferos, existen diversas estrategias que las especies usan dependiendo de sus necesidades. El momento y la frecuencia de este evento son dos de los principales determinantes de la historia de vida de un organismo y por lo tanto, de la estrategia reproductiva que cada especie utiliza (Famoso et al., 2018). Las principales estrategias corren a cargo de la hembra, es decir todo el costo energético es cubierto por la hembra, por ejemplo: la implantación retardada, la diapausa embrionaria, o la ovulación postergada (Altringham, 2011; Crichton, 2000; William V. Holt & Alireza Fazeli, 2016; P. A. Racey & Entwistle, 2000). Sin embargo, existe una estrategia que es compartida entre ambos sexos: el almacenamiento prolongado de espermatozoides.

La habilidad de las hembras de almacenar espermatozoides en su tracto reproductor después de la copula, esta reportada en varias especies de vertebrados. La duración de este almacenamiento varía en las diferentes clases de vertebrados, desde un par de horas hasta varios años. Morfológicamente, el almacenamiento de espermatozoides en el tracto reproductor femenino ha desarrollado una variedad de sitios especializados para mantener a los gametos, mientras que muchas especies (especialmente mamíferos) usan partes del mismo aparato reproductor, como la vagina, el útero, la unión útero-tubárica y en los cuernos uterinos y la vida fértil de los espermatozoides está directamente ligada a la duración del estro (Crichton, 2000; William V. Holt & Alireza Fazeli, 2016; Krishna & Roy, 2017; P. A. Racey & Entwistle, 2000), reptiles y aves poseen túbulos de almacenamiento ciegos que mantienen la viabilidad de los gametos durante periodos variables de tiempo. Los objetivos principales de esta estrategia es separar la copulación de la fertilización y aumentar la competencia espermática,

extendiendo el periodo de tiempo que los eyaculados de distintos machos coinciden en el tracto reproductor femenino.(Birkhead & Møller, 1993; Holt & Lloyd, 2010; William V. Holt & Alireza Fazeli, 2016; Krishna & Roy, 2017)

1.2.1 Almacenamiento prolongado de espermatozoides

El almacenamiento prolongado se define como la retención de espermatozoides viables por tiempos prolongados en el tracto reproductor de alguno de los dos sexos. Se caracteriza por(Crichton, 2000; W. Holt & Lloyd, 2010; W. V. Holt & Fazeli, 2016):

- Cese de la espermatogénesis
- Asincronía de las funciones reproductivas primarias entre ambos sexos
- Reproducción de tipo estacional.
- La concepción no depende de una inseminación cercana a la ovulación.

En comparación con otras clases de vertebrados en donde se ha reportado el almacenamiento espermático, en la generalidad de los mamíferos, este proceso no excede más de 20 días (la media se encuentra entre los 5-15 días), esto se debe en el caso del macho a la cantidad de testosterona disponible, que suele estar relacionada con la presencia de las células de Leydig durante la espermatogénesis y en las hembras, se debe a que este periodo está asociado con la duración del estro (Altringham, 2011; Birkhead & Møller, 1993; Crichton, 2000). Esta estrategia reproductiva está reportada en varios órdenes de mamíferos, como: marsupiales, carnívoros, roedores, lagomorfos, ungulados, primates y murciélagos (Weir & Rowlands, 1973).

Como ya se mencionó anteriormente en las hembras se ha reportado el almacenamiento reproductivo en todo el tracto reproductor, desde la vagina hasta la unión útero-tubaria. Mientras en el macho se ha reportado principalmente en la cauda epididimaria, glándulas accesorias y algunos órganos especialmente adaptados para ello, como glándulas sexuales accesorias (Birkhead & Møller, 1993);.

2 Antecedentes

2.1 Maduración y almacenamiento espermático en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*

El orden Chiroptera, es considerado el segundo orden más diverso y con una distribución (Fig. 4) casi global (exceptuando el ártico y la antártica). Es lógico que respondiendo a las exigencias del ambiente donde habitan cada una de las especies de este orden, existan una gran variedad de peculiaridades que modifiquen los eventos reproductivos de la hembra (estro-embarazo-lactancia) y por lo tanto del macho, originando una gran variación en relación a ciclos climáticos anuales y estacionales, que ajustan los periodos de espermatogénesis, ovogénesis, cópula y fecundación a las estaciones que mejor garanticen la supervivencia y el crecimiento de los neonatos.

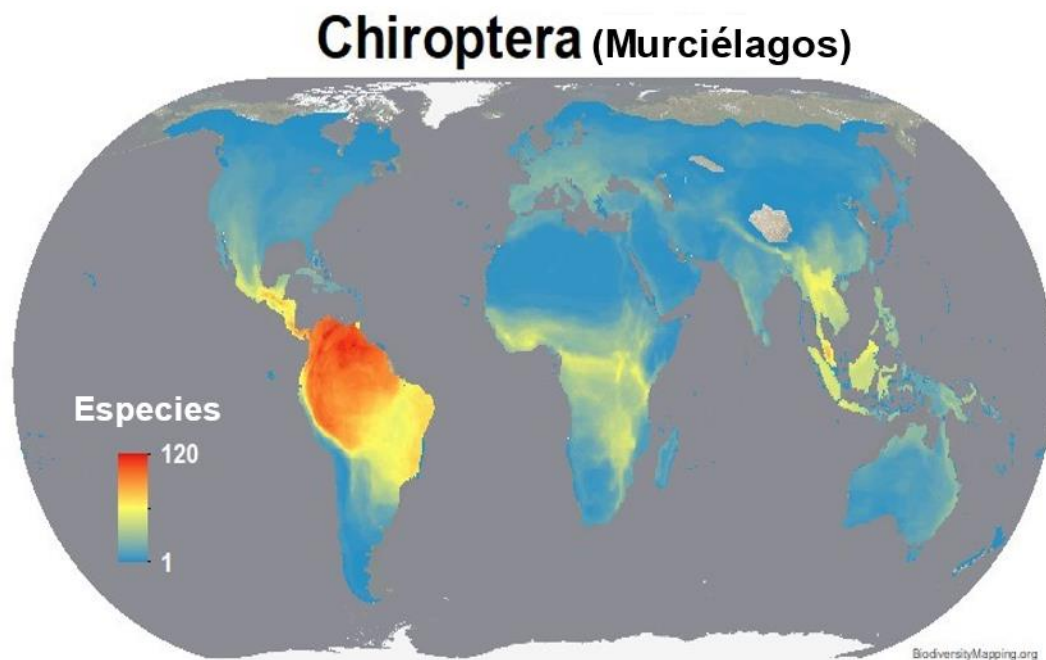


Fig. 4 Distribución mundial del orden Chiroptera, mapa tomado y modificado de Bowker (2000)

Los murciélagos tienen historias de vida distintivas, que los separan de los mamíferos de su tamaño, caracterizadas por la longevidad, los múltiples eventos reproductivos, un tamaño de camada pequeño y una madurez sexual tardía

(Altringham, 2011; Crichton, 2000; Gaisler, 1989). Los dos patrones reproductivos presentes en este grupo son: a) la monoestría, que es definida como un patrón con una repetición cíclica única y precisa de estro-embarazo-lactancia cada año y; b) la poliestría, definida como el conjunto de dos o tres ciclos estrales al año, que pueden ser continuos, interrumpidos por anestros, implantación retardada o diapausa embrionaria (Altringham, 2011)

Debido a que la reproducción es energéticamente cara, y por lo tanto la disponibilidad de alimento es un factor importante en la abundancia de hembras con la energía necesaria para reproducirse, los ciclos reproductivos de los murciélagos se han visto influenciados, sus ciclos estrales presentan diferente duración, dependiendo del tipo de patrón reproductivo que tenga la especie (Altringham, 2011; Crichton, 2000; Heideman, 2000; W. V. Holt & A. Fazeli, 2016; Krutzsch, 2000; McCracken & Wilkinson, 2000; P. A. Racey & Entwistle, 2000) .

En muchas especies de murciélagos, el estro es atenuado (16-200 días), es decir que los estrógenos se mantienen en concentraciones relativamente altas durante un periodo superior a un estro normal. Esto tiene como resultado espermatozoides fértiles retenidos en el tracto reproductor femenino por periodos que exceden lo reportado en otras especies. Algunos murciélagos que residen en zonas templadas del mundo (la mayoría de las familias Vespertilionidae o Rhinolophidae), presentan una retención de espermatozoides viables tanto en el tracto reproductivo del macho como de la hembra, después del cese anual de la espermatogénesis (Crichton, 2000). En estas especies, el almacenamiento coincide con el invierno y la hibernación, cuando el metabolismo se ve reducido. (Crichton, 2000; Krishna & Roy, 2017).

La inseminación toma lugar varias semanas después de iniciar la hibernación, cuando ya hay forrajeo de manera activa y existen pocas reservas de grasa (Altringham, 2011; Crichton, 2000; Heideman, 2000; W. V. Holt & A. Fazeli, 2016; Krutzsch, 2000). La retención de los espermatozoides en murciélagos de zonas templadas está asociado a otras estrategias reproductivas, que le permiten

interrumpir el ciclo reproductivo durante el periodo de hibernación, como la ovulación postergada (Crichton, 2000; Krishna & Roy, 2017).

Tanto la foliculogénesis como la espermatogénesis son iniciados en el verano y concluyen poco antes del otoño, siendo las secreciones androgénicas circundantes en el macho suficientes para que la libido se mantenga para el momento de la copula y el mantenimiento de las funciones de las glándulas accesorias. Se ha demostrado a través de varios experimentos que esta cantidad de andrógenos es más que suficiente para mantener a los espermatozoides viables más de un mes durante el almacenamiento en la cauda epididimaria, que puede iniciar en otoño y concluir hasta primavera. En el caso de las hembras el almacenamiento inicia en invierno y termina en primavera, cuando la ovulación ocurre.



Fig. 5 Murcielago mula mexicano (*Corynorhinus mexicanus*). Foto tomada de NaturaLista

Corynorhinus mexicanus (Fig. 5), conocido comúnmente como murciélago orejudo mexicano, es una especie endémica de México que se distribuye en las zonas templadas de las principales sierras del país. Debido a las condiciones extremas

que se presentan en estos biomas durante el invierno, este murciélago entra en un aletargamiento fisiológico que le ayuda a ahorrar la energía y que repercute en su patrón reproductivo monoéstrico estacional, desplazando las funciones reproductivas en ambos sexos propiciando que ocurran de manera asincrónica (León-Galván, Fonseca, López-Wilchis, & Rosado, 1999; López-Wilchis, 1989; Rodríguez-Tobón, Arenas-Ríos, & León-Galván, 2010). La foliculogénesis comienza en agosto, concluyendo a finales de noviembre, fecha en las que ocurren las copulas, la ovulación ocurre a finales de enero (por lo que se considera como ovulación postergada) y la gestación inicia en febrero, teniendo una duración de aproximadamente 60 días. En el caso de los machos, la espermatogénesis inicia en mayo, y se pueden encontrar los primeros espermatozoides en la cabeza del epidídimo en agosto y pueden ser almacenados en la cauda, hasta finales de enero (León-Galván et al., 1999; López-Wilchis, 1989; Rodríguez-Tobón et al., 2010).

Al existir la asincronía entre la disponibilidad de hembras receptivas al final de la gametogénesis, se origina el primer periodo de almacenamiento de espermatozoides, que puede durar aproximadamente 4 meses en la cauda epididimaria. Una vez que ocurren las copulas, y los espermatozoides son inseminados a nivel del útero, los gametos no encuentran las condiciones necesarias para fertilizar el ovocito, debido a que la ovulación no ha ocurrido en esta especie, generando el segundo periodo de almacenamiento de gametos, en el que serán almacenados tres meses más a nivel del útero.

Esta estrategia ocasiona que, en los machos de esta especie, la mayoría de los espermatozoides que ingresan al epidídimo, pasen rápidamente a la región caudal, por lo que, el proceso de maduración espermática que en otras especies culmina en las dos primeras regiones del epidídimo, en *C. mexicanus*, la maduración termina en la región caudal y depende del periodo de almacenamiento. Para comprobarlo, Cervantes y colaboradores en el 2008, sometieron a los espermatozoides al proceso de capacitación y reacción acrosomal *in vitro*, encontrando que los espermatozoides obtenidos en las

primeras fechas de almacenamiento se obtenía un porcentaje de capacitación del 16% y un mes después de ser almacenados, este porcentaje aumentaba hasta ser cercano al 30%. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con la capacidad para capacitarse, aun en el periodo de cópula, sigue siendo bajo en comparación con lo reportado para otros mamíferos, tomando en consideración que, solo las células maduras podrían llevar a cabo los procesos antes mencionados.

Rodríguez-Tobón y colaboradores en 2016, determinaron la cantidad de fosforilación de tirosina en espermatozoides obtenidos de la región caudal, a lo largo del periodo de almacenamiento, concluyendo que: el proceso de maduración de los espermatozoides de *C. mexicanus* finaliza en la región caudal y que está relacionada con el largo periodo en que los espermatozoides se encuentran almacenados en la cauda epididimaria. Sin embargo, en la generalidad de los mamíferos, el potencial para fertilizar aumenta de manera gradual desde la cabeza hasta la cola del epidídimo. En algunas especies esta capacidad se obtiene en la parte distal del cuerpo del epidídimo o un poco antes, pero está bien reconocido que en la mayoría de las especies de mamíferos, los espermatozoides extraídos de la cauda del epidídimo pueden capacitarse en un porcentaje superior al 50% y son capaces de fertilizar con un porcentaje superior al 60% (Cooper & Yeung, 2006; Robaire et al., 2006; Yeung et al., 1996). Debido a la existencia un segundo periodo de almacenamiento prolongado en el tracto reproductor femenino del murciélago *C. mexicanus*, nos indica la posible existencia de un proceso de maduración, equivalente a la maduración en el epidídimo e independiente a la capacitación espermática que, podría continuar en el tracto genital de la hembra.

3 Justificación

Los murciélagos que presentan almacenamiento prolongado de espermatozoides son un modelo excepcional para el estudio de los procesos fisiológicos que le competen al espermatozoide para adquirir su potencial fertilizante, ya que, debido a sus diversas adaptaciones únicas presentes en estas especies, es posible detallar fenómenos que en especies con otros tipos de reproducción no lo permiten.

Un buen ejemplo de ello es la maduración espermática, ya que en la generalidad de los mamíferos se ha observado que el espermatozoide madura de forma gradual en su paso por las distintas secciones anatómicas del epidídimo. Es decir, se obtiene un aumento gradual del potencial fertilizante, dependiendo de la región donde se obtengan. Por ejemplo, en la cauda epididimaria, se localizan los espermatozoides maduros, por lo tanto, tendrán un mayor índice de fertilización, si se comparan contra los que puedan extraerse del *caput*, sección donde se localizan espermatozoides no maduros.

En el caso de *Corynorhinus mexicanus* la mayoría de los espermatozoides que ingresaron al epidídimo, pasan rápidamente a la región caudal, por lo que, el proceso de maduración espermática no culmina en las dos primeras regiones de este, observándose un aumento progresivo del potencial fertilizante asociado con el tiempo de almacenamiento en la región caudal del epidídimo. Y en comparación a otros mamíferos, el porcentaje de espermatozoides maduros que se encuentran en la cauda epididimaria de esta especie, es considerablemente menor, llegando a porcentajes similares a los que se reportan de espermatozoides obtenidos del *corpus* del epidídimo en otras especies, como la rata (Robaire et al., 2006).

Aunado a esto, la hembra de *C. mexicanus* presenta un periodo de almacenamiento de tres meses en el útero, dejando la posibilidad de que el proceso de maduración de los espermatozoides no haya concluido. Esto favorecía su encuentro con el ovocito, el cual es liberado del folículo hasta el término del periodo de almacenamiento. Es por todo lo anterior que, el almacenamiento prolongado de espermatozoides en esta especie, la convierte en uno de los mejores candidatos para comprender los mecanismos de adaptación, y si es que existe un proceso de maduración dentro del tracto femenino, previo e independiente a la capacitación espermática.

El desarrollo de la investigación, no solo nos permitirá conocer de manera más profunda los procesos bioquímicos por los cuales los gametos de esta especie obtienen su potencial fertilizante, adicionalmente, ayudará a proponer alternativas de conservación de espermatozoides en otras especies de mamíferos con un

patrón reproductivo similar, aplicando los conocimientos obtenidos en el presente modelo.

4 Pregunta de investigación

¿Existe un proceso fisiológico o bioquímico anterior o independiente a la capacitación espermática en el tracto reproductivo de la hembra del murciélago *C. mexicanus*, durante el periodo de almacenamiento?

5 Hipótesis

Si el proceso de maduración espermática epididimaria en mamíferos está caracterizada por los bajos niveles de $[Ca^{2+}]_i$, $[pH]_i$ y fosforilación de tirosinas, entonces, si el proceso de maduración espermática continua o se posterga durante el almacenamiento prolongado en el tracto reproductor de las hembras de *Corynorhinus mexicanus*, se esperaría encontrar niveles bajos de $[Ca^{2+}]_i$, un aumento del $[pH]_i$ y niveles de fosforilación de tirosinas, previos a la ovulación.

6 Objetivos

6.1 General

Determinar si existe un proceso de maduración anterior a la capacitación espermática, durante el prolongado periodo de almacenamiento en la hembra del murciélago *C. mexicanus*.

6.2 Específicos

1. Analizar distintos indicadores fisiológicos como: el $[Ca^{2+}]_i$, el $[pH]_i$, la externalización de fosfatidilserina (PS) y la fosforilación de tirosina (P-Tyr).

7 Material y métodos

- **Obtención de ejemplares:**

Los muestreos se realizaron en los meses del periodo de almacenamiento espermático en el tracto reproductor femenino (noviembre, diciembre y enero), capturando 3 murciélagos hembras en el refugio de “El Túnel” (19° 37´14” N y 98° 02´02” W), ubicado en el municipio de Tlaxco, Tlaxcala. Para la captura de los murciélagos se contó con la Licencia de colecta científica o con propósitos de enseñanza en materia de vida silvestre, Modalidad A (SEMARNAT-08-049-A), brindada al Doctor Ahiezer Rodríguez Tobón con folio SGPA/DGV/07397/19. Los animales se capturaron durante el día cuando se encontraban dormidos, utilizando una red de golpeo. Para fines del estudio, las tres hembras seleccionadas se consideraron adultas, bajo el criterio de la osificación completa de la epífisis de cuarta falange del ala (Kunz & Anthony, 1982). Se les tomaron las medidas morfométricas estándar (longitud antebrazo, cola, oreja, pata, longitud somática total y longitud de la tibia) (Medellín, Arita, & Sanchez-Herrera, 1997) posteriormente se colocaron en un saco de manta individual y se transportaron vivas hasta la UAM-Iztapalapa.

- **Obtención de espermatozoides:**

Los espermatozoides se obtuvieron de acuerdo con la técnica propuesta por León-Galván (1997). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, para posteriormente ser colocados sobre su dorso en una placa de unicel donde se fijaron con alfileres para poder realizarles una incisión ventral desde la región terminal del esternón hasta el hueso pélvico, teniendo así, acceso al tracto reproductor. Antes de extraer el tracto, éste se ligó con hilo de seda en ambos oviductos por su parte distal con respecto al cuerno uterino y se lavó por reflujó pasando un volumen de 800 µl de medio Ringer frío, para mantener las condiciones semejantes a las proporcionadas por el sitio de almacenamiento, a través de la aguja de una jeringa del número 27, introduciéndola por la vagina. El contenido se colectó en un tubo de polipropileno de 2 ml. La solución obtenida, se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos, para separar los espermatozoides del fluido

vaginal. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 500 µl de medio Ringer frío.

- **Análisis de espermatozoides**

Posterior al lavado de los espermatozoides, se tomó una alícuota de 50 µl para diluirla con 950 µl de agua destilada y hacer el conteo de concentración espermática con una cámara de Neubauer. Se adicionaron 5 microlitros para llenar ambos lados de la cámara y se dejó reposar 1 minuto. Los conteos se realizaron por observación bajo microscopia de contraste de fases en un microscopio de luz transmitida con el objetivo de 40 X.

- **Análisis de vitalidad**

Para determinar la cantidad de células vivas, se tomó una alícuota de 10 µl y se mezcló con 5 µl de eosina-nigrosina sobre un portaobjetos para realizar un frotis. Las células se dejaron secar sobre una termo platina a 37°C, posteriormente, se realizó el conteo: células vivas, cuya membrana celular aun es impermeable al colorante y; células muertas, cuya membrana plasmática ha perdido su capacidad impermeable al colorante y permite la entrada de este, dando como resultado una tinción en tonos rojizos/rosáceos, esta discriminación se realizó con ayuda de un microscopio óptico y ayuda de un contador (León-Galván, Fonseca, López-Wilchis, & Rosado, 1999a; WHO, 1994).

- **Capacitación**

Esta técnica se realizó tomando 2 alícuotas de 1×10^6 células/mL y colocándolas en medio BWW (NaCl, KCl 4,78, Lactato de $\text{Ca}5\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , Piruvato de Na, Lactato de Na Glucosa) suplementado con 0.1% de BSA a 37°C con 5 % CO_2 , estas alícuotas fueron sometidas a un cambio de pH, una de ellas se capacito a 7.2 y la otra a 8, durante 6 horas. Después del tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 10 µl de espermatozoides capacitados y se fijaron con PAF 12%, posteriormente se tiñeron agregando CTC a una relación (1:1). Para su lectura en el microscopio de fluorescencia, se adicionaron 10 µl con

DABCO-glicerol para mantener la fluorescencia del colorante por más tiempo (Cervantes et al., 2008; Rodríguez-Tobón et al., 2016).

- **Determinación del $[Ca^{2+}]_i$**

Se tomó una alícuota de 1×10^6 células/mL y se le agregó 1 μ l de Fluo 3 AM (2 mM), en un tubo eppendorf con un volumen final de 100 μ l y se incubaron por 30 min a 37°C con 5 % de CO₂, protegidos de la luz. Posteriormente, se lavó el exceso de colorante a 2500 rpm por 5 min y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron con 500 μ l de medio BWW sin suplementar. Este volumen se pasó a un tubo de citómetro cubierto de la luz y se dejaron 2 h, (Mata-Martinez et al., 2013; Matamoros-Volante & Treviño, 2020). Para el análisis en el citómetro de flujo, se tomaron alícuotas de 0.5×10^6 espermatozoides y se evaluaron 10,000 células por muestra en cada una de las condiciones estudiadas. Se colectaron los histogramas de distribución que arroja el citómetro y fueron analizados con el software Flowing Software 2, en todas las muestras se tomó el porcentaje de espermatozoides marcados y la intensidad de fluorescencia, ambos parámetros se encontraban en las unidades arbitrarias que da el software, por lo que se calculó un índice de fluorescencia (IF) multiplicando el porcentaje de espermatozoides marcados por la media de la intensidad de fluorescencia.

- **Fosforilación de tirosinas**

Se tomó una alícuota de 1×10^6 células/mL y se fijó con PAF al 2 % por 10 minutos a 4°C. Después de ese tiempo se centrifugaron a 2500 rpm x 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron con 10 μ l de saponina al 0.05%, se dejaron con el detergente durante 10 minutos a temperatura ambiente, a ese mismo tubo se le agregaron 5 μ l de BSA al 0.1% y 5 μ l de Tween 20 al 0.1%, se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron a 2500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y suspendimos con 100 μ l de PBS con BSA al 0.01%. Se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfotirosinas (PY-20) a 2 mg/L y secundario IgG-I (0.1 μ l) y se dejaron incubar a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, los espermatozoides se lavaron a 2500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 500 μ l de PBS, este

volumen se pasó a un tubo de citómetro protegido de la luz (Rodríguez-Tobón et al., 2016). Para el análisis en el citómetro de flujo, se tomaron alícuotas de 0.5×10^6 espermatozoides y se evaluaron 10,000 células por muestra en cada una de las condiciones estudiadas. Se colectaron los histogramas de distribución que arroja el citómetro y fueron analizados con el software Flowing Software 2, en todas las muestras se tomó el porcentaje de espermatozoides marcados y la intensidad de fluorescencia, ambos parámetros se encontraban en las unidades arbitrarias que da el software, por lo que se calculó un índice de fluorescencia (IF) multiplicando el porcentaje de espermatozoides marcados por la media de la intensidad de fluorescencia

- **Fosfatidilserina**

Se tomó una alícuota de 1×10^6 células/mL y centrifugamos a 2500 rpm por 5 minutos. Posterior a esto, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron con 100 μ l de Buffer 1 X, se le agregaron 10 μ l de Anexina V (Annexin V-FITC Kit-MACS Miltenyi Biotec), y se incubó durante 15 minutos a 37 °C cubierto de la luz. Posterior a esto, se lavó el excedente de células a 2500 rpm por 5 min, una vez lavadas se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 500 μ l del buffer. Este volumen se pasó a un tubo de citómetro cubierto de la luz (Modificado de López-Trinidad, 2017) y momentos antes de realizar medición en el citómetro, se le agregó Yoduro de Propidio, con la finalidad de poder distinguir con la ayuda de este colorante las células vivas de las células muertas. Para el análisis en el citómetro de flujo, se tomaron alícuotas de 0.5×10^6 espermatozoides y se evaluaron 10,000 células por muestra en cada una de las condiciones estudiadas. Se colectaron los histogramas de distribución que arroja el citómetro y fueron analizados con el software Flowing Software 2, en todas las muestras se tomó el porcentaje de espermatozoides marcados y la intensidad de fluorescencia, ambos parámetros se encontraban en las unidades arbitrarias que da el software, por lo que se calculó un índice de fluorescencia (IF) multiplicando el porcentaje de espermatozoides marcados por la media de la intensidad de fluorescencia

- **Análisis estadísticos:**

A los datos obtenidos, se les aplicó una prueba de Kolmogórov-Smirnov, si los datos se ajustaban a una distribución normal, se les realizó dependiendo de la cantidad de datos obtenidos, una prueba de ANOVA seguida de una prueba HSD Tukey o una t de Student para destacar diferencias significativas, considerando un valor significativo de $p < 0.05$. De no cumplir normalidad, los datos se comparaban usando la prueba de Kruskal-Wallis o una Prueba U de Mann-Whitney. En el caso de los valores porcentuales estos fueron transformados al arcoseno (X) para realizar las pruebas estadísticas correspondientes, sin embargo, se presentan valores porcentuales.

8 Resultados

8.1 Viabilidad y concentración espermática

En la figura 6, se presenta la viabilidad (6A) y concentración (6B) de espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino de *C. mexicanus* durante los meses de almacenamiento. Observamos una viabilidad menor, en el mes de diciembre ($t=8.48$, $p=0.014$), pero no encontramos diferencias en la concentración espermática ($t=2.50$, $p=0.13$).

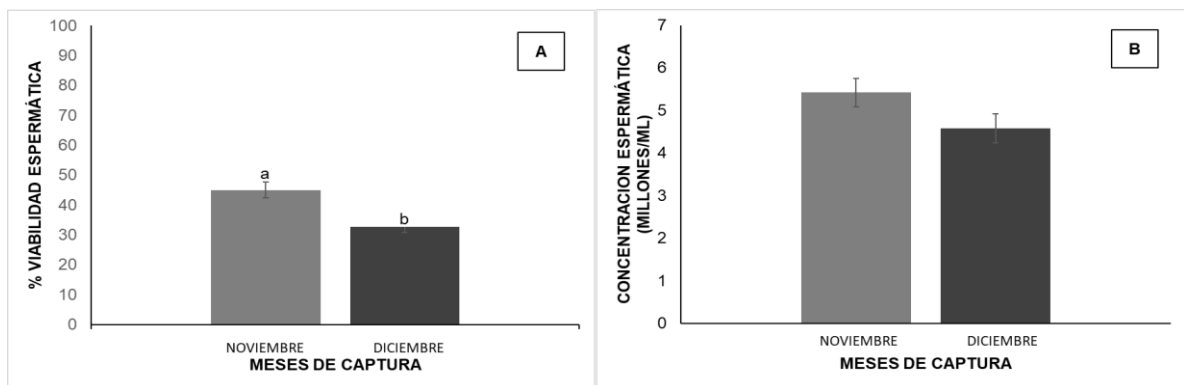


Fig. 6 Viabilidad (A) y concentración (B) de espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino de *C. mexicanus*. Las barras representan el promedio \pm ES. Diferentes letras representan diferencias significativas a $p<0.05$, t de Student.

8.2 Capacitación

En la figura 7, se presenta el porcentaje de espermatozoides capacitados, obtenidos del tracto reproductor femenino del murciélago *C. mexicanus*. En el mes de noviembre se observa una capacitación a pH 7.3 de 34% contra el 37% obtenido de los espermatozoides capacitados a pH 8, se observa una diferencia de 3%. Esta diferencia tiene significancia estadística ($F=8.6$, $p= 0.02$), indicando que los espermatozoides que se capacitaron en un pH mayor se capacitaron en mayor proporción. En el mes de diciembre, reportamos una capacitación de 34% en el pH 7.2, mientras que en el pH 8 un porcentaje de 37%, a pesar de presentar un aumento del 3% no se observa significancia estadística 37% ($F=0.32$, $p= 0.6$). Al comparar los porcentajes de capacitación de ambos meses obtenemos diferencias estadísticamente significativas ($F= 7.8$, $p=0.02$), esto indica un aumento en los porcentajes de maduración asociados al tiempo de almacenamiento.

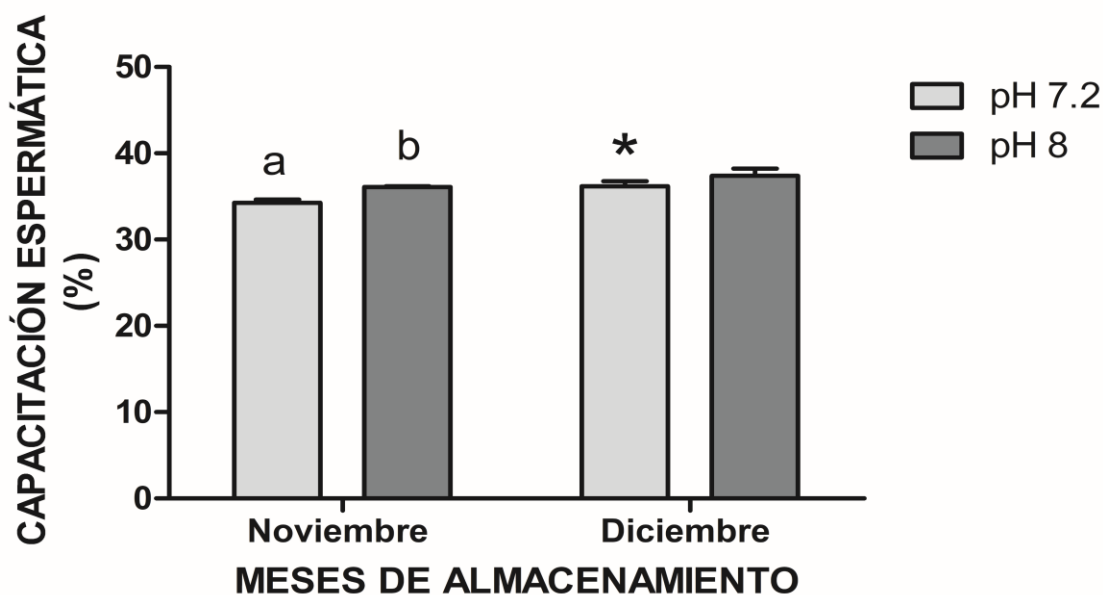


Fig. 7 Porcentaje de espermatozoides capacitados en diferentes fechas de obtención a partir de tracto reproductor femenino del murciélago *C. mexicanus*. Las barras representan el promedio \pm ES. Diferentes letras señalan diferencias significativas entre pH ($F=8.6$, $p= 0.02$), y el asterisco señala diferencias entre meses ($F= 7.8$, $p=0.02$), ANOVA; HSD de Tukey.

8.3 Calcio intracelular

En la figura 8, se observa la concentración de calcio intracelular en espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino del murciélago *C. mexicanus*, en condiciones no capacitantes, en el mes de noviembre los espermatozoides presentaban 1.4×10^4 IF, en comparación del mes de diciembre donde presentaban 1.9×10^4 IF, se observa un aumento de 0.5×10^4 IF que no presenta diferencias significativas entre los meses de captura ($U=2.00$, $p=0.1$).

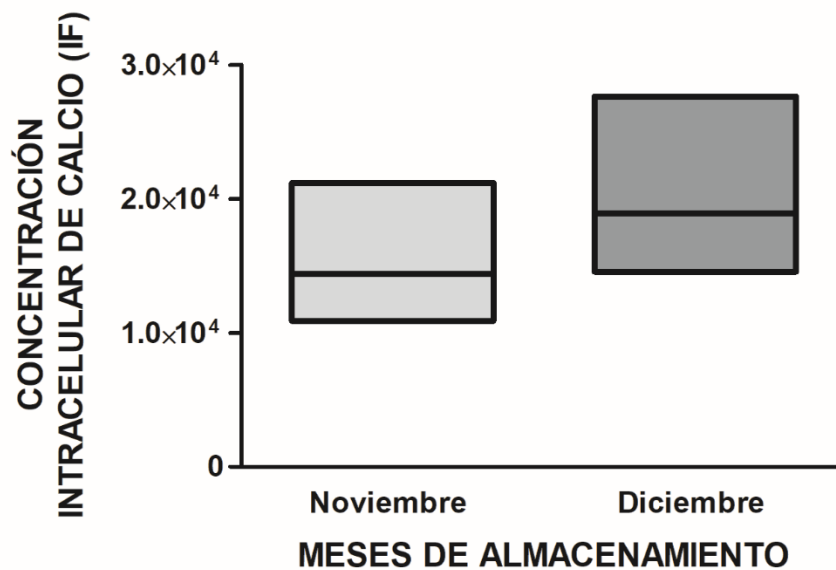


Fig. 8 Concentración de calcio intracelular Las barras representan el promedio del de fluorescencia emitida por el FLUO-3AM \pm el ES, no existen diferencias estadísticamente significativas ($U=2.00$, $p>0.05$), U de Mann-Whitney.

8.4 Externalización de fosfatidilserina

En la figura 9, se observa el porcentaje y las intensidades de fluorescencia de externalización de fosfatidilserina en la membrana de los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino del murciélago *C. mexicanus*. En el mes de noviembre se obtuvo un porcentaje de 8% y 0.6×10^4 IF, mientras que en el mes de diciembre se reportó un porcentaje de 15% y 1.4×10^4 IF, se observa un aumento del 7% y 0.8×10^4 IF. Esto muestra diferencias significativas entre los meses de captura ($t=1.3$, $p=0.3$). Indicando que existe un aumento tanto en el porcentaje de los espermatozoides que presentan la externalización de fosfatidilserina, como un aumento de la fosfatidilserina externalizada.

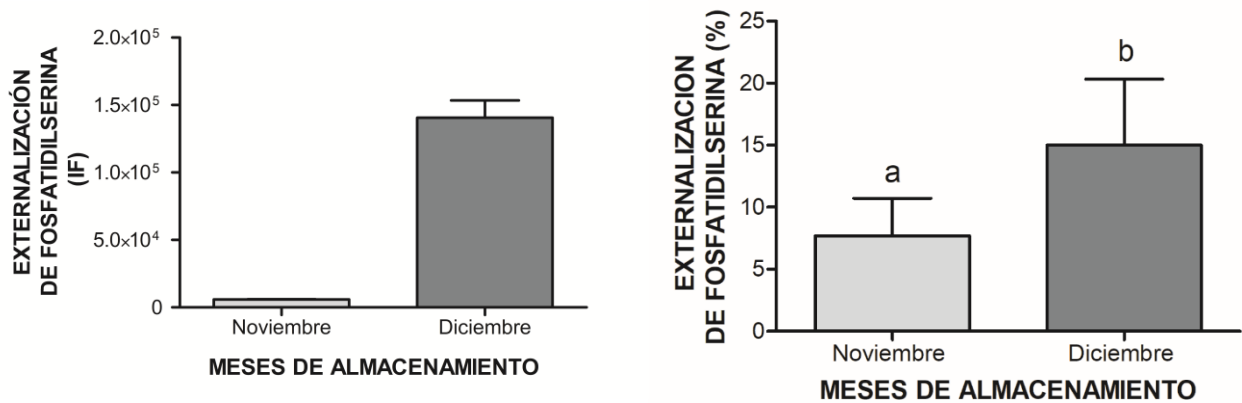


Fig. 9 Porcentaje de externalización de fosfatidilserina Las barras representan el promedio de externalización de fosfatidilserina \pm ES. Diferentes letras señalan diferencias significativas ($t=1.3$, $p<0.05$), t de Student.

8.5 Fosforilación de tirosinas

En la Figura 10, se observa la fosforilación de tirosinas en los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino durante el almacenamiento, en el mes de noviembre se reporta 1.1×10^4 IF, mientras que en diciembre 1.9×10^4 IF, se reporta un aumento de 0.7×10^4 IF que no tiene significancia estadística ($t=1.8$, $p=0.2$) mayor fosforilación de tirosinas en los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino del murciélago *C. mexicanus* en el mes de diciembre, indicaría un proceso fisiológico que se está ocurriendo en el tracto reproductor femenino, anterior a la capacitación.

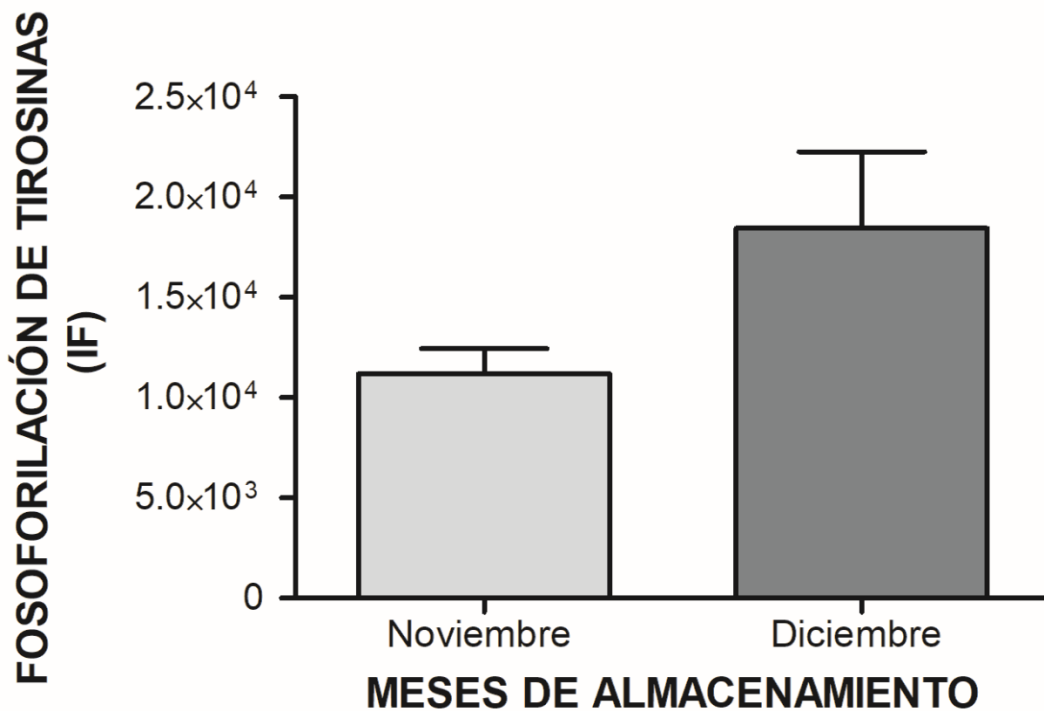


Fig.. 10 Fosforilación de tirosinas en espermatozoides Las barras representan el promedio del índice de fluorescencia emitida por pY20 \pm ES, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($t=1.8$, $p>0.05$), con una prueba pareada *t* de Student.

9 Discusión

Debido a las condiciones extremas, que se presentan en la sierra de Tlaxcala durante el invierno, el murciélago *Corynorhinus mexicanus* entra en un aletargamiento fisiológico que le ayuda a ahorrar energía, desplazando las principales funciones reproductivas de ambos sexos para que ocurran de manera asincrónica. Ya que la gametogénesis es un evento costoso energéticamente hablando, los machos deben llevarlo a cabo durante el verano, donde la abundancia de alimento es considerable. Por otro lado, las hembras deben esperar a que pase el invierno para asegurar su supervivencia y la de su cría, por lo que en esta especie se presentan dos periodos de almacenamiento prolongado. En el macho inicia desde el mes de septiembre y se extiende hasta los meses de noviembre-diciembre, cuando se presentan las copulas (Cervantes et al., 2008; Rodríguez-Tobón et al., 2016). En la hembra este periodo empieza en noviembre-diciembre y se extiende hasta que la ovulación ocurre a finales de enero, principios de febrero (León-Galván, Fonseca, López-Wilchis, & Rosado, 1999b; López-Wilchis, 1989)

Es necesario resaltar que entre los trabajos anteriormente realizados con *Corinorhynchus mexicanus*, en el refugio de “El Túnel” en los años de 1989 y 1999 (León-Galván et al., 1999b; López-Wilchis, 1989) y el presente estudio realizado en 2019, las fechas en las que el periodo reproductivo inicia y concluye, se ven alteradas, ya que en 1989 y 199 se reporta la presencia de espermatozoides en el tracto reproductor femenino desde el mes de octubre, a diferencia de nuestros datos, que muestran la presencia de espermatozoides solo en noviembre y diciembre.

Nosotros observamos que, para la segunda semana de enero, se encontraba presencia de embriones en las tres hembras capturadas, mientras que León-Galván y colaboradores (1999), los reportan en el mes de febrero, al igual que lo reportado por López-Wilchis (1989), donde observaron la formación de la colonia de maternidad a inicios de este mes, en su mayoría conformada por hembras gestantes.

Este desfase de las épocas reproductivas podría deberse a las condiciones ambientales, ya que los preparativos para la reproducción deben comenzar con la suficiente antelación para otorgar el tiempo adecuado para el desarrollo gonadal, la producción de gametos, el establecimiento de territorios de reproducción y gestación. Este período puede tomar a lo menos dos meses en roedores pequeños y hasta un año o más, en mamíferos superiores. De esto se deduce que los animales son dependientes de las señales ambientales, que son a menudo denominados factores proximales (temperatura, humedad, alimento), estos les informará cuando iniciar su proceso reproductivo (Altringham, 2011; Weir & Rowlands, 1973)

En teoría, cualquier factor ambiental puede ser determinante para dar inicio al periodo reproductivo, pero la evolución asegura que los indicadores más seguros han sido seleccionados, es decir, aquellos que no fluctúen a lo largo de los años (Weir & Rowlands, 1973). Es por esto por lo que algunos animales han incluido en su fisiología, relojes anuales que miden estos ritmos de la naturaleza de manera constante y aguda de modo que se han vuelto extremadamente vitales para la sincronización de la reproducción. Por ejemplo, las Jirafas paren a sus crías cuando los árboles de acacia tienen las hojas crecidas (Bustos Obregón & Torres-Díaz, 2012). Siendo en el caso de los quirópteros, los componentes clima y alimento los determinantes para iniciar su reproducción, debido al gran costo energético que involucra el proceso reproductivo en estos animales. Por lo anterior cualquier modificación en estos, puede generar un desfase en las épocas reproductivas de un año a otro. En especies como *Scotophilus heathii*, un murciélago asiático se puede observar la importancia de la condición corporal en la reproducción de murciélagos, ya que mientras el pico máximo de producción de espermatozoides en el macho está determinado por el aumento en el peso testicular, asociado al incremento en la actividad de forrajeo durante el verano, lo que le permite aumentar su condición corporal para poder correr con el gasto energético que involucra la gametogénesis. En la hembra es una baja en la glucosa y un aumento en los ácidos grasos libres, determinados por la condición corporal del animal al inicio del invierno, lo que permite el almacenamiento

prolongado de espermatozoides, si estas condiciones no se proporcionan, el periodo de almacenamiento disminuye (Qureshi, 2016). En la localidad de Tlaxco, se ha observado un incremento en las temperaturas ambientales desde 1989 hasta el 2010, reportados por la Estación Meteorológica Tlaxco (00029032) del Instituto Meteorológico Nacional (2010). Este aumento podría estar actuando de manera similar en las poblaciones de *Corynorhinus mexicanus*, alterando su ciclo reproductivo, adelantando los eventos reproductivos.

Al trabajar con animales de vida silvestre, la influencia de las condiciones ambientales cambian drásticamente a lo largo de un ciclo anual, afectan de manera directa al organismo de diversas formas, entre ellas en la disponibilidad de alimento, en combinación estos dos factores modifican todo el mecanismo fisiológico reproductivo de una especie (Altringham, 2011; Qureshi, 2016), esto toma importancia debido a que en quirópteros, el factor alimento es determinante para el inicio de la reproducción y por lo tanto de la gametogénesis (Heideman, 2000). Teniendo como consecuencia, la disminución en la viabilidad y concentración espermática que se encuentra almacenada en el útero de la hembra, así como el periodo de almacenamiento.

En *Rhinolophus ferrumequinum korai*, se ha reportado que debido a los cambios drásticos en las temperaturas de su habitat, existe una afectación directa al desarrollo del epidídimo durante su época reproductiva, ya que existe una disminución los periodos de infiltración de espermatozoides provenientes de los testículos, dando como resultado una baja concentración espermática así como una reducción en la viabilidad de los gametos, adelantando el periodo de eliminación de las células por medio de leucocitos y la actividad fagocítica de las células del epitelio epididimario, acortando el periodo de almacenamiento, así como la protección brindada por el ambiente de la cauda epididimaria (Lee, 2018). Este proceso de eliminación y baja calidad espermática continua en el tracto reproductor de la hembra de esta especie donde los espermatozoides que no son aptos para mantenerse almacenados son liberados por las células del epitelio endometrial, donde se encontraban anclados para su protección, fagocitados por

leucocitos (Lee, 2018, 2020). En condiciones óptimas este proceso de eliminación permite mantener el ambiente intrauterino limpio y listo para la implantación del óvulo. Sin embargo, con los cambios en la temperatura se observó una disminución del número espermatozoides que llegaron al sitio de fertilización (Lee, 2020). En *C. mexicanus*, se observó que tras la modificación a la técnica descrita por León-Galván y colaboradores en 1999, con la que reportan una concentración de $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ de espermatozoides almacenados, obtuvimos una concentración espermática (Fig.6B) en el mes de noviembre de $5.4 \times 10^6/\text{mL}$ y $4.6 \times 10^6/\text{mL}$ en diciembre, se observa un decremento de 0.8, que estadísticamente no es significativo ($t= 2.50$, $p>0.05$). Estos resultados estarían indicando que la cantidad de espermatozoides se mantiene constante a lo largo del periodo de almacenamiento y que la ligera disminución es debido a la eliminación de espermatozoides no aptos para la fertilización, al igual que en el caso de *Myotis lucifugus*, (otra especie que presenta el almacenamiento prolongado) donde las cabezas de los espermatozoides se hunden profundamente en las hendiduras de las células epiteliales, lo que les proporciona mantenimiento y protección durante el almacenamiento (P. Racey, Uchida, Mori, Avery, & Fenton, 1987; P. A. Racey & Entwistle, 2000); protección que en yeguas, ratón y cerdo consiste en la producción de proteínas que son secretadas por las células epiteliales del sitio de almacenamiento, entre las que destacan: proteínas de choque térmico hsp70 kDa 1A, hsp90, hspA8 (anteriormente conocido como hsc70) y proteína regulada por glucosa 78 (GRP78), ayudando a extender la vida útil del espermatozoide (Boilard et al., 2004; Daugaard, Rohde, & Jäättelä, 2007; Lachance, Bailey, & Leclerc, 2007; Lloyd, Fazeli, Watson, & Holt, 2012; Moein-Vaziri et al., 2014; Tytell, Greenberg, & Lasek, 1986). Al existir una alteración en las condiciones durante el almacenamiento, este sistema de protección podría fallar, promoviendo la disminución del porcentaje de viabilidad espermática.

Si bien los factores biológicos juegan un papel crucial, también se deben considerar los factores que se encuentran intrínsecos en todos los procedimientos para el uso de gametos *in vitro*, que los exponen a condiciones nocivas que pueden estar presentes en el laboratorio y aunque estas estén controladas, aún

pueden dañar al espermatozoide. Como puede ser el efecto en del estrés en la célula, durante el estudio realizado por León-Galván y colaboradores (1999), se reportó una viabilidad espermática del 65%, mientras que en el presente estudio se observó una disminución del porcentaje de viabilidad (Fig. 6A) de 12.3%, entre los meses de noviembre (45%) con respecto a diciembre (33%), esta diferencia tuvo significancia estadística ($t=0.01$, $p<0.05$). Esta diferencia pudo deberse a que la eutanasia de los ejemplares fue realizada en campo por León-Galván y colaboradores (1999). Esto disminuyó la exposición al estrés de los murciélagos, que se ve reflejado especialmente a nivel celular en la expresión génica, es decir al repertorio de proteínas presentes en las células que se encargan de dar una respuesta adecuada para mitigar los efectos nocivos del estrés y promover la adaptación celular a la nueva situación ambiental, afectando el funcionamiento y viabilidad de las células (Berlanga Chiquero, 2016; Bustos Obregón & Torres-Díaz, 2012). Por otra parte, una de las principales consecuencias del almacenamiento prolongado, es que los gametos deben modificar distintos procesos fisiológicos para permanecer viables durante el tiempo que sea necesario para poder fertilizar al ovocito, en esta especie se ha reportado por Cervantes y colaboradores en 2008, y Rodríguez-Tobón et al. en 2016, que el proceso de maduración espermática epididimaria es muy largo, ya que no culmina con la llegada de los espermatozoides a la cauda epididimaria, si no que continua durante todo su tiempo de almacenamiento. Sin embargo, se desconocía si los gametos habían alcanzado su potencial fertilizante una vez que ingresaban al tracto reproductor femenino.

Debido a que en la hembra se presenta un periodo similar de almacenamiento espermático, es necesario determinar si existe un periodo de maduración previo al proceso de capacitación espermática, como adaptación al proceso de almacenamiento. Así, para conocer el estado de maduración de los gametos, fue necesario someterlos a capacitación *in vitro*. Asociado directamente al estado de capacitación espermática se encuentra el pH al que los gametos estén expuestos, ya que esta íntimamente relacionado con el correcto funcionamiento del gameto masculino, observando que existen diversos transportadores de iones y enzimas

exclusivas del espermatozoide, que son dependientes del cambio en esta variable o están directamente relacionadas con su regulación, entre ellas las encargadas de regular el proceso de capacitación y responden a pH alcalinos, como la acción de la Adenilato Ciclasa soluble, altamente dependiente de la alcalinización del pH intracelular y una de las enzimas que inicia la cascada de señalización para el aumento en la fosforilación de tirosinas (Baro Graf et al., 2020) respondiendo a pH que se aproximen al que se encuentra en el sitio de fertilización, por lo tanto solo aquellos espermatozoides que son maduros podrán regular la alcalinización del pH intracelular, esto es debido a que moléculas encargadas de la regulación del pH como la anhidrasa carbónica IV (CARIV), aparecen en la superficie del espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo y permanecen retenidas en la membrana del espermatozoide maduro (Baro Graf et al., 2020). Ya que en muchas especies se considera que los espermatozoides se mantienen inmóviles, en general se cree que ese estado quiescente es mantenido por la acidificación del pH intracelular del gameto, ya que las dinein ATPasas encargadas de generar el batido flagelar son altamente dependientes al pH intracelular, además que también se ha reportado que distintos canales iónicos, como el CatSper o el sNHE, encargados de la homeostasis iónica durante la capacitación y posterior reacción acrosomal necesitan, la alcalinización del medio intracelular para poder funcionar.

Para corroborar si en esta especie sucede lo mismo, la Capacitación *in vitro* se llevó a cabo en dos pH diferentes. En el mes de noviembre se obtuvo un porcentaje de 34 % en espermatozoides capacitados, en comparación con los incubados en pH 8, que fue de 36 %. Este aumento tiene significancia estadística ($F= 5.33$, $p < 0.05$). En el mes de diciembre el porcentaje en espermatozoides incubados en pH 7.2 fue de 35%, contra 38% de los incubados en pH 8. Entre meses se observa un aumento progresivo entre los espermatozoides capacitados en pH 7.2 de 1% y contra el 2% de aumento entre los capacitados a pH 8, esto indicaría que los espermatozoides que se mantienen almacenados durante un mes en el tracto reproductor femenino, estarían respondiendo de mejor manera al pH que se encuentra en el sitio de fertilización, considerando que esta regulación

es crucial para la fertilización, este aumento estaría sugiriendo un proceso fisiológico (Chavez et al., 2019).

En conjunto a lo reportado en 2008 por Cervantes y colaboradores, en fechas previas a las copulas de esta especie el porcentaje de espermatozoides capaces de capacitarse es de un 33% y que este aumento está relacionado con el tiempo que los gametos están almacenados en la cauda epididimaria, se puede observar que después de ser inseminados en el tracto reproductor femenino durante aproximadamente un mes se observa un aumento en este marcador de la maduración de ~1%, aunque este aumento no es significativo, esta tendencia al incremento de gametos capacitados permanece constante en el mes de diciembre, donde se presenta un aumento significativo ($p < 0.05$) de 2% con respecto a lo obtenido en el último mes de almacenamiento en el macho. En comparación con lo descrito para generalidad de los mamíferos, que el porcentaje de los espermatozoides capaces de capacitarse es superior al 40% , como es en el caso de roedores donde se ha reportado que los gametos masculinos que se encuentran en la cauda se capacitan en un porcentaje que varía del 50-73%, en cerdos 60-75%, en humanos va del 58-61%, en carneros se reportan 45% de espermatozoides capacitados (Robaire et al., 2006) e incluso en otros murciélagos como *Artibeus jamaicensis*, donde reportan que los espermatozoides obtenidos de la cauda epididimaria necesitan incubarse 8 horas, para alcanzar de 53-64% de espermatozoides capacitados (Álvarez-Guerrero et al., 2016)

Que los porcentajes obtenidos por espermatozoides almacenados en el tracto reproductor femenino de *Corynorhinus mexicanus* durante dos meses aumenten de manera progresiva entre meses y aun pH más alcalino, estaría indicando que el proceso de maduración espermática podría continuar durante el periodo de almacenamiento prolongado de esta especie por lo que se puede observar que a mayor tiempo de almacenamiento, los espermatozoides de esta especie parecerían estar alcanzando el mismo porcentaje que otras especies alcanzan en el tracto reproductor masculino.

Al ser la capacidad para capacitarse el marcador indirecto del estado de maduración del espermatozoide que estamos evaluando, es importante considerar, que los factores que la modulan deben incrementar conforme pasa el tiempo, para así poder aumentar el porcentaje de los espermatozoides capacitados

- 1) El papel del pH en la fisiología del espermatozoide: está relacionado con la correcta función y activación de diversas proteínas necesarias para que la cascada de señalización de la capacitación inicie, un ejemplo, sería la activación de canales iónicos de calcio, como el CatSper (T. Nishigaki et al., 2014)
- 2) El calcio como segundo mensajero: una vez los canales iónicos que permiten la entrada de calcio se activa, se registra un aumento en las concentraciones intracelulares de este ion, lo que permite la síntesis de Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPC), induciendo la movilidad hiperactivada; además de jugar un papel central en la reacción acrosomal y en el proceso de fusión de las membranas en el espermatozoide (Takuya Nishigaki, Romero, & Sánchez-Guevara, 2016[Chavez, 2019 #19]).
- 3) Externalización de fosfatidilserina: es una alteración en la distribución normal de los fosfolípidos de la bicapa, resultado de la pérdida de su estructura asimétrica, lo que permite la hiperactivación del flagelo (Nagata, Sakuragi, & Segawa, 2020; Claudia M Rival et al., 2019; Shin & Takatsu, 2020)
- 4) Fosforilación de tirosinas: tiene un papel importante durante la hiperactivación, que, a su vez es necesaria para la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida. Mientras que las proteínas redistribuidas en la membrana durante la capacitación se someten a fosforilación de tirosina en las regiones del cuello y acrosoma al unirse a la zona pelúcida (Bae et al., 2020; N. G. Brukman et al., 2019; Ijiri, Mahbub Hasan, & Sato, 2012).

En los animales que entran en torpor, como *Corynorhinus mexicanus* la regulación del pH, debe tener un constante equilibrio entre el pH de los medios intracelular y extracelular para el correcto funcionamiento del sistema, uno de los principales efectos que se deben prevenir es la tendencia a la alcalinización debido al decremento de la temperatura. Esta se regula con la presión parcial del dióxido de carbono en la sangre ($p\text{CO}_2$) y el bicarbonato, en combinación buffers como albumina y fosfatos. Al aumentar la solubilidad del CO_2 cuando la temperatura desciende, por lo que su presión parcial disminuye y se alcaliniza el medio, los vasos sanguíneos se consideran un sistema cerrado y el sistema buffer de CO_2 -bicarbonato modula la alcalinización, junto con los residuos histidil de proteínas y polipéptidos, como el imidazol cuya disociación se mantiene constante aun en la variación de la temperatura, este contiene un anillo capaz de aceptar protones y donarlos, esto ayuda a mantener la función de las proteínas (Kim & Milsom, 2019). Se ha reportado que durante el periodo de torpor, el pH extracelular se acidifica llegando aproximadamente a 6, una vez que el metabolismo se vuelve a la normalidad, este se alcaliniza (Kim & Milsom, 2019) . En el espermatozoide, el pH intracelular es el regulador principal de la movilidad del flagelo, siendo el bicarbonato la principal molécula encargada de alcalinizar el medio y con ello promover la capacitación espermática (Chavez et al., 2019) y esta al encontrarse involucrada en la regulación del pH extracelular, a través de la hidratación del CO_2 a H_2CO_3 en una reacción reversible y muy eficiente catalizada por la anhidrasa carbónica (Fiñana, Cejudo, & Fernández, 2001), disminuyendo sus concentraciones disponibles para alcalinizar el medio, previniendo el aumento del calcio intracelular, la externalización de fosfatidilserina y la fosforilación de tirosinas, necesarias para iniciar la capacitación espermática posterior al periodo de almacenamiento (Achikanu, Pendekanti, Teague, & Publicover, 2018; A. E. Carlson et al., 2003; Hwang et al., 2019; Lishko et al., 2012; Takuya Nishigaki et al., 2016; Qi et al., 2007; Sun et al., 2017; Vicente-Carrillo, Álvarez-Rodríguez, & Rodríguez-Martínez, 2017).

En el caso de las mediciones de calcio intracelular, marcado por FLUO-3AM de los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino (Fig. 7) se observa

una tendencia al aumento en la concentración de este ion, de lo encontrado en el mes de noviembre (1.4×10^4 IF) al mes de diciembre (1.9×10^4 IF). Estadísticamente este aumento no es significativo ($U=2.00$, $p>0.05$), lo que estaría indicando la estabilidad de este marcador durante el almacenamiento prolongado y eso es lo que se esperaba ya que la concentración de calcio intracelular es uno de los moduladores más importantes de la fisiología espermática. Durante la capacitación espermática, la concentración intracelular de este ion debe aumentar para producir la hiperactivación y posteriormente la reacción acrosomal y está asociado a la alcalinización intracelular (Darszon et al., 2011; Swann, 1994). En comparación con lo reportado en otras especies durante su estadio en la cauda del epidídimo, la concentración reportada del calcio dentro del espermatozoide es de 0.5 mEq/L, se observa un aumento en la concentración del calcio. Sin embargo, esta elevación no es suficiente para inducir la cascada de señalización de la capacitación (Robaire et al., 2006). En especies como el ratón, el cerdo, búfalo, humano o la rata, se ha reportado que la intensidad de fluorescencia alcanzada en espermatozoides capacitados es por lo menos el doble de la que se obtuvo en el presente estudio, esto sugeriría que los espermatozoides de esta especie modifican su fisiología en un proceso anterior a la capacitación espermática y necesaria para llegar a este estado (R. J. Aitken et al., 2015; Macias-Garcia et al., 2015; Peris-Frau et al., 2020b; Visconti et al., 1995).

Esto se ve apoyado por la externalización de fosfatidilserina, ya que para que el proceso de capacitación se lleve a cabo es necesario que exista la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide. Uno de los principales cambios es la externalización de fosfolípidos de la cara interna de la membrana, uno de los más representativos, es la fosfatidilserina, que, si bien no se encuentra en gran cantidad, el 99% de este fosfolípido se encuentra internalizado en la membrana plasmática lo que la hace un marcador muy puntual (Kurz, Viertel, Herrmann, & Muller, 2005; Nagata et al., 2020; C. M. Rival et al., 2019; Shin & Takatsu, 2020). Si bien este marcador ha sido más relacionado con la apoptosis, en los últimos años se ha demostrado que la vía de externalización durante la capacitación es diferente, ya que es llevada a cabo por las escramblasas, cuya

actividad está relacionada con el aumento del calcio intracelular y por lo tanto con la alcalinización del medio (Nagata et al., 2020; Shin & Takatsu, 2020). En los espermatozoides de *C. mexicanus* obtenidos del tracto reproductor femenino, durante el almacenamiento espermático en hembras, se observa un aumento del porcentaje de externalización de este fosfolípido (Fig. 9), en los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino del 7%, entre los meses de noviembre (8%) y diciembre (15%). Este aumento es estadísticamente significativo ($t = -2.4$, $p < 0.05$), y aunque los datos sugieren una tendencia al aumento, este se encuentra por debajo del 50% que se ha reportado como el porcentaje necesario para que un espermatozoide se considere capacitado.

En resumen, la secuencia de eventos para desencadenar la capacitación inicia una vez se da la alcalinización del medio intracelular del espermatozoide, en respuesta al ambiente extracelular, se inicia la activación de canales iónicos que aumentan el calcio intracelular, desencadenando dos fenómenos: la externalización de fosfatidilserina por acción de las escramblasas activadas por el aumento de este ion y la activación de la vía de señalización para la fosforilación de tirosinas. Esta modificación postraducciona es necesaria para la activación del movimiento hiperactivado del flagelo, el último paso de la capacitación espermática (Freitas et al., 2017).

Al igual que los indicadores anteriores, en la fosforilación de tirosinas, marcado con el anticuerpo pY20, se observa un aumento progresivo entre los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino en el mes de noviembre 1.1×10^4 IF contra el mes de diciembre 1.8×10^4 IF, este aumento no tiene significancia estadística $= -0.05$ $p > 0.05$ (Fig. 10). En comparación a lo obtenido por Rodríguez-Tobón y colaboradores en 2016, donde reporta una fosforilación de tirosinas mucho menor en la última fecha de almacenamiento en el macho (0.2×10^4 IF), se puede observar una tendencia al aumento en este indicador asociado al tiempo de almacenamiento que los gametos de esta especie pasan almacenados en el tracto reproductor femenino. Sin embargo, no se puede considerar que estos estén capacitándose, ya que según reportes de otras

especies lo mínimo que se debe alcanzar para que un espermatozoide se considere capacitado es de 5×10^4 IF (Peris-Frau et al., 2020a). Como se ha observado, estos datos en conjunto sugieren la continuación del proceso de maduración en el tracto reproductor femenino posiblemente regulado a través del estado metabólico del animal durante el largo periodo de almacenamiento prolongado, a través del pH extra e intracelular.

10 Conclusión

El aumento en los indicadores de maduración como $[Ca^{2+}]_i$, externalización de fosfatidilserina y fosforilación de tirosinas asociado al tiempo de almacenamiento, sugieren que los espermatozoides de esta especie tienen un proceso de maduración previo a la capacitación que culmina en el tracto reproductor femenino, reflejado en el aumento porcentaje de espermatozoides capaces de capacitarse en el último mes de almacenamiento.

11 Bibliografía

- Instituto Meteorológico Nacional. (2010). Normales Climatológicas por Estado. Normales Climatológicas por Estado. Recuperado 24 de noviembre de 2020, de <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=tlax>
- Acevedo, P. C. L., & Maya, W. D. C. (2017). Selección espermática in vitro: espermatozoides con mejores características funcionales. *Urología Colombiana*, 26(1), 26-33.
- Achikanu, C., Pendekanti, V., Teague, R., & Publicover, S. (2018). Effects of pH manipulation, CatSper stimulation and Ca^{2+} -store mobilization on $[Ca^{2+}]_i$ and behaviour of human sperm. *Hum Reprod*, 33(10), 1802-1811. doi:10.1093/humrep/dey280
- Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular reproduction and development*, 84(10), 1039-1052.
- Aitken, R. J., Baker, M. A., & Nixon, B. (2015). Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl*, 17(4), 633-639. doi:10.4103/1008-682X.153850
- Allais-Bonnet, A., & Pailhoux, E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2, 56.
- Altringham, J. D. (2011). *Bats: from evolution to conservation*: Oxford University Press.
- Álvarez-Guerrero, A., González-Díaz, F., Medrano, A., & Moreno-Mendoza, N. (2016). In vitro capacitation and acrosome reaction in sperm of the phyllostomid bat *Artibeus jamaicensis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52(4), 454-465.

- Arenas-Ríos, E., León-Galván, M., Mercado, P., López-Wilchis, R., Cervantes, D., & Rosado, A. (2007). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *148*(1), 150-158.
- Arenas-Ríos, E., Rodríguez-Tobón, A., Trinidad, B. P. L., Sandoval, F. M. R., Tobón, E. R., Jimenez-Salazar, J. E., & León-Galván, M. A. (2014). Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana deficiencias*, *1*, 73.
- Arenas-Ríos, E., Rosado García, A., Cortés-Barberena, E., Königsberg, M., Arteaga-Silva, M., Rodríguez-Tobón, A., . . . 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.
- Bae, J.-W., Im, H., Hwang, J.-M., Kim, S.-H., Ma, L., Kwon, H. J., . . . Kwon, W.-S. (2020). Vanadium adversely affects sperm motility and capacitation status via protein kinase A activity and tyrosine phosphorylation. *Reproductive Toxicology*, *96*, 195-201.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.07.002>
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Stival, C., Luque, G. M., Gentile, I., Buffone, M. G., & Krapf, D. (2020). Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. *Molecular and cellular endocrinology*, *518*, 110992.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110992>
- Bedford, J. M. (2004). Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc*, *79*(2), 429-460. doi:10.1017/s146479310300633x
- Berlanga Chiquero, J. J. (2016). Respuesta al estrés celular: Implicaciones en envejecimiento y otras patologías relacionadas con la edad. *Encuentros Multidisciplinares*.
- Bernećic, N. C., Gadella, B. M., Leahy, T., & de Graaf, S. P. (2019). Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology*, *137*, 56-66.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.038>
- Birkhead, T., & Møller, A. (1993). Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biological Journal of the Linnean Society*, *50*(4), 295-311.
- Boilard, M., Reyes-Moreno, C., Lachance, C., Massicotte, L., Bailey, J., Sirard, M.-A., & Leclerc, P. (2004). Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biology of reproduction*, *71*(6), 1879-1889.
- Bowker, G. C. (2000). Mapping biodiversity. *International Journal of Geographical Information Science*, *14*(8), 739-754.
- Brukman, Nuñez, S. Y., Puga Molina, L. d. C., Buffone, M. G., Darszon, A., Cuasnicu, P. S., & Da Ros, V. G. (2019). Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca²⁺ entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(4), 5276-5288.
- Brukman, N. G., Nunez, S. Y., Puga Molina, L. D. C., Buffone, M. G., Darszon, A., Cuasnicu, P. S., & Da Ros, V. G. (2019). Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca(2+) entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation. *J Cell Physiol*, *234*(4), 5276-5288.
doi:10.1002/jcp.27337
- Buffone, M. G. (2016). Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization.
- Bustos Obregón, E., & Torres-Díaz, L. (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, *30*(4), 1266-1279.

- Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., . . . Babcock, D. F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(25), 14864-14868.
- Carlson, B. M. (2019). *Embriología humana y biología del desarrollo*: Elsevier.
- Cervantes, M. I., Arenas-Rios, E., Leon-Galvan, M. A., Lopez-Wilchis, R., Ambriz, D., & Rosado, A. (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Syst Biol Reprod Med*, *54*(4-5), 196-204. doi:10.1080/19396360802334466
- Chavez, J. C., Darszon, A., Trevino, C. L., & Nishigaki, T. (2019). Quantitative Intracellular pH Determinations in Single Live Mammalian Spermatozoa Using the Ratiometric Dye SNARF-5F. *Front Cell Dev Biol*, *7*, 366. doi:10.3389/fcell.2019.00366
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian journal of andrology*, *13*(1), 130.
- Cooper, T. G., & Yeung, C.-H. (2006). Sperm maturation in the human epididymis. *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 72-107.
- Crichton, E. G. (2000). Sperm storage and fertilization. In *Reproductive biology of bats* (pp. 295-320): Elsevier.
- Cuasnicú, P. S., Cohen, D. J., Ellerman, D. A., Busso, D., Da Ros, V. G., & Morgenfeld, M. M. (2002). Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In *The epididymis: from molecules to clinical practice* (pp. 389-403): Springer.
- Dacheux, J.-L., & Dacheux, F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, *147*(2), R27-R42.
- Darszon, A. (2008). Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. c. *Instituto de Biotecnología de la UNAM*, *25*, 29-42.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews*, *91*(4), 1305-1355.
- Daugaard, M., Rohde, M., & Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters*, *581*(19), 3702-3710.
- De Jonge, C. J., & Barratt, C. (2006). *The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration*: Cambridge University Press.
- Famoso, N. A., Hopkins, S. S., & Davis, E. B. (2018). How do diet and body mass drive reproductive strategies in mammals? *Biological Journal of the Linnean Society*, *124*(2), 151-156.
- Fiñana, I. T., Cejudo, A. G., & Fernández, E. (2001). pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos. *Amortiguadoras*, *3*, 1-11.
- Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S., & Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of reproduction*, *96*(1), 2-12.
- Gadella, B. M., & Visconti, P. E. (2006). Regulation of capacitation. *The Sperm Cell*, 134-169.
- Gaisler, J. (1989). The rK selection model and life-history strategies in bats. European Bat Research 1987. In: Charles University Press, Prague, Czech Republic.
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, *5*(2), 204-218.
- Guthrie, H., & Welch, G. (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, *78*(8), 1700-1708.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2007). *Reproducción e inseminación artificial en animales*: McGraw-hill.
- Heideman, P. D. (2000). Environmental regulation of reproduction. In *Reproductive biology of bats* (pp. 469-499): Elsevier.
- Holt, W., & Lloyd, R. (2010). Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well? *Theriogenology*, *73*(6), 713-722.

- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2016). Sperm Storage in the Female Reproductive Tract. *Annu Rev Anim Biosci*, 4, 291-310. doi:10.1146/annurev-animal-021815-111350
- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2016). Sperm Storage in the Female Reproductive Tract. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 291-310. doi:10.1146/annurev-animal-021815-111350
- Hwang, J. Y., Mannowetz, N., Zhang, Y., Everley, R. A., Gygi, S. P., Bewersdorf, J., . . . Chung, J. J. (2019). Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell*, 177(6), 1480-1494 e1419. doi:10.1016/j.cell.2019.03.047
- Ijiri, T. W., Mahbub Hasan, A. K., & Sato, K. (2012). Protein-tyrosine kinase signaling in the biological functions associated with sperm. *J Signal Transduct*, 2012, 181560. doi:10.1155/2012/181560
- Jones, R., & Murdoch, R. (1996). Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. *Reproduction, fertility and development*, 8(4), 553-568.
- Jonge, D. (2017). Biological basis for human capacitation—revisited. *Human reproduction update*, 23(3), 289-299.
- Kim, A. B., & Milsom, W. K. (2019). pH regulation in hibernation: Implications for ventilatory and metabolic control. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 237, 110536. doi:10.1016/j.cbpa.2019.110536
- Krishna, A., & Roy, V. K. (2017). Mechanisms of Sperm-Storage in Female Reproductive Tract in Bats. *Reproductive Biology, Physiology and Biochemistry of Male Bats*, 1, 103-118.
- Krutzsch, P. H. (2000). Anatomy, physiology and cyclicity of the male reproductive tract. In *Reproductive biology of bats* (pp. 91-155): Elsevier.
- Kunz, T. H., & Anthony, E. L. (1982). Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 63(1), 23-32.
- Kurz, A., Viertel, D., Herrmann, A., & Muller, K. (2005). Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction*, 130(5), 615-626.
- Lachance, C., Bailey, J. L., & Leclerc, P. (2007). Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Human reproduction*, 22(10), 2606-2614.
- Lee, J.-H. (2018). Morphological changes of cauda epididymis, sperm infiltration into cauda epididymis, sperm storage and sperm disappearance of cauda epididymis in *Rhinolophus ferrumequinum korai* (Chiroptera: Rhinolophidae). *The European Zoological Journal*, 85(1), 118-127.
- Lee, J.-H. (2020). Female annual reproductive cycle of *Rhinolophus ferrumequinum korai* (Chiroptera: Rhinolophidae): morphological changes and prolonged sperm storage and sperm fate of the female reproductive tract according to month. *The European Zoological Journal*, 87(1), 156-169.
- León-Galván, M. A., Fonseca, T., López-Wilchis, R., & Rosado, A. (1999a). 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. doi:10.1139/cjz-77-1-7
- León-Galván, M. A., Fonseca, T., López-Wilchis, R., & Rosado, A. (1999b). 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.
- Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J., & Clapham, D. E. (2012). The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annual review of physiology*, 74(1), 453-475. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153258

- Lloyd, R., Fazeli, A., Watson, P., & Holt, W. (2012). The oviducal protein, heat-shock 70-kDa protein 8, improves the long-term survival of ram spermatozoa during storage at 17° C in a commercial extender. *Reproduction, fertility and development*, 24(4), 543-549.
- López-Wilchis, R. (1989). Biología de *Plecotus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae) en el estado de Tlaxcala, México. *Unpublished Doctoral thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.*
- Macias-Garcia, B., Gonzalez-Fernandez, L., Loux, S. C., Rocha, A. M., Guimaraes, T., Pena, F. J., . . . Hinrichs, K. (2015). Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. *Reproduction*, 149(1), 87-99. doi:10.1530/REP-14-0457
- Martin-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Calle-Guisado, V., Gonzalez-Fernandez, L., Garcia-Marin, L., & Bragado, M. J. (2018). AMPK Function in Mammalian Spermatozoa. *Int J Mol Sci*, 19(11). doi:10.3390/ijms19113293
- Mata-Martinez, E., Darszon, A., & Trevino, C. L. (2018). pH-dependent Ca(+2) oscillations prevent untimely acrosome reaction in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun*, 497(1), 146-152. doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.042
- Mata-Martinez, E., Jose, O., Torres-Rodriguez, P., Solis-Lopez, A., Sanchez-Tusie, A. A., Sanchez-Guevara, Y., . . . Trevino, C. L. (2013). Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *J Vis Exp*(75), e50344. doi:10.3791/50344
- Matamoros-Volante, A., & Treviño, C. L. (2020). Capacitation-associated alkalization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *Journal of Cell Science*, 133(2), jcs238816. doi:10.1242/jcs.238816
- Mayren-Mendoza, F. d. J., Vergara-Onofre, M., de Lourdes Juárez-Mosqueda, M., Toledano-Olivares, Á., Rosales-Torres, A. M., & Ávalos-Rodríguez, A. (2012). Participación de enzimas translocasas en la reacción acrosomal del espermatozoide de conejo. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(1), 1-13.
- McCracken, G. F., & Wilkinson, G. S. (2000). Bat mating systems. In *Reproductive biology of bats* (pp. 321-362): Elsevier.
- Medellín, R. A., Arita, H. T., & Sanchez-Herrera, O. (1997). *Identificación de los murciélagos de México: clave de campo*: Asociación Mexicana de Mastozoología.
- Moein-Vaziri, N., Phillips, I., Smith, S., Alminana, C., Maside, C., Gil, M. A., . . . Pockley, A. G. (2014). Heat-shock protein A8 restores sperm membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. *Reproduction*, 147(5), 719-732.
- Nagata, S., Sakuragi, T., & Segawa, K. (2020). Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Current Opinion in Immunology*, 62, 31-38.
- Nishigaki, T., Jose, O., Gonzalez-Cota, A. L., Romero, F., Trevino, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun*, 450(3), 1149-1158. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.100
- Nishigaki, T., Romero, F., & Sánchez-Guevara, Y. (2016). CatSper, el canal de Ca²⁺ que regula el batido flagelar del espermatozoide en eucariontes.
- Peris-Frau, P., Martín-Maestro, A., Iniesta-Cuerda, M., Sánchez-Ajofrín, I., Cesari, A., Garde, J. J., . . . Soler, A. J. (2020a). Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*, 145, 100-108.
- Peris-Frau, P., Martín-Maestro, A., Iniesta-Cuerda, M., Sánchez-Ajofrín, I., Cesari, A., Garde, J. J., . . . Soler, A. J. (2020b). Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*, 145, 100-108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.046>
- Phillips, D. (2012). *Spermiogenesis*: Elsevier.

- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., . . . Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(4), 1219-1223.
- Qureshi, A. S., Shahla, Nargis, Zeeshan, Akbar Shah. (2016). Effect of Natural Environmental Conditions on the Reproductive Histomorphometric Dynamics in the Male Yellow House Bats (*Scotophilus heathii*). *EC Veterinary Science*, *2*, 151-158.
- Racey, P., Uchida, T., Mori, T., Avery, M., & Fenton, M. (1987). Sperm—epithelium relationships in relation to the time of insemination in little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Reproduction*, *80*(2), 445-454.
- Racey, P. A., & Entwistle, A. C. (2000). Life-history and reproductive strategies of bats. In *Reproductive biology of bats* (pp. 363-414): Elsevier.
- Rival, C. M., Xu, W., Shankman, L. S., Morioka, S., Arandjelovic, S., Lee, C. S., . . . Isakson, B. E. (2019). Phosphatidylserine on viable sperm and phagocytic machinery in oocytes regulate mammalian fertilization. *Nature communications*, *10*(1), 1-13.
- Rival, C. M., Xu, W., Shankman, L. S., Morioka, S., Arandjelovic, S., Lee, C. S., . . . Ravichandran, K. S. (2019). Phosphatidylserine on viable sperm and phagocytic machinery in oocytes regulate mammalian fertilization. *Nat Commun*, *10*(1), 4456. doi:10.1038/s41467-019-12406-z
- Robaire, B., Hinton, B. T., & Orgebin-Crist, M.-C. (2006). The epididymis. In *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (pp. 1071-1148): Elsevier.
- Rodríguez-Tobón, A., Arenas-Ríos, E., & 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.
- Rodríguez-Tobón, A., Fierro, R., León-Galván, M. A., Rosado, A., Cortés-Barberena, E., & Arenas-Ríos, E. (2016). Tyrosine phosphorylation as evidence of epididymal cauda participation in the sperm maturation process of *Corynorhinus mexicanus* bat. *Acta Zoologica*, *97*(3), 310-318.
- Shin, H.-W., & Takatsu, H. (2020). Phosphatidylserine exposure in living cells. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *55*(2), 166-178. doi:10.1080/10409238.2020.1758624
- Sun, X.-h., Zhu, Y.-y., Wang, L., Liu, H.-l., Ling, Y., Li, Z.-l., & Sun, L.-b. (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *15*(1), 1-12.
- Swann, K. (1994). Ca²⁺ oscillations and sensitization of Ca²⁺ release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell calcium*, *15*(4), 331-339.
- Tytell, M., Greenberg, S., & Lasek, R. (1986). Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain research*, *363*(1), 161-164.
- Vicente-Carrillo, A., Álvarez-Rodríguez, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2017). The CatSper channel modulates boar sperm motility during capacitation. *Reproductive biology*, *17*(1), 69-78. doi:<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.01.001>
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, *121*(4), 1129-1137.
- Weir, B. J., & Rowlands, I. (1973). Reproductive strategies of mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *4*(1), 139-163.
- WHO. (1994). *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*: Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

- Wu, K., Mei, C., Chen, Y., Guo, L., Yu, Y., & Huang, D. (2019). C-type natriuretic peptide regulates sperm capacitation by the cGMP/PKG signalling pathway via Ca²⁺ influx and tyrosine phosphorylation. *Reproductive BioMedicine Online*, 38(3), 289-299. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.025>
- Yeung, C., Morrell, J., Cooper, T., Weinbauer, G., Hodges, J., & Nieschlag, E. (1996). Maturation of sperm motility in the epididymis of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *International journal of andrology*, 19(2), 113-121.
- Zhou, J., Chen, L., Li, J., Li, H., Hong, Z., Xie, M., . . . Yao, B. (2015). The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. *PLoS One*, 10(7), e0132974. doi:10.1371/journal.pone.0132974