



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS ANTI-SUBSTANCIAS
REACTIVAS DE OXÍGENO (SRO) EN LAS FUNCIONES
TESTÍCULARES Y EPIDIDIMARIAS EN EL MURCIÉLAGO**

Corynorhinus mexicanus.

T E S I S

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

B. E. EDITH ARENAS RÍOS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TUTOR: DR. EFRAÍN MERCADO PICHARDO
ASESOR: M. BRA. MIGUEL ÁNGEL LEON GALVÁN
ASESOR: DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA
ASESOR: DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALÚD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA, APROBARÓN LA PRESENTE TESIS EL DÍA 28 DE JUNIO DE 2004.



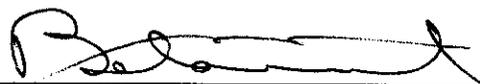
Dr. Efraín Mercado Pichardo
Presidente



M en BRA Miguel Ángel León Galván
Secretario



Dr. Adolfo Rosado García
Vocal



Dr. Miguel Betancourt Rule
Vocal

INDICE

PÁGINAS

1. Introducción	03
1.1. Substancias reactivas de oxígeno (SRO) y sus implicaciones sobre la estructura y función de los espermatozoides	03
1.2. Sistema enzimático de protección en contra de las SOR.	08
1.3. Producción de SOR durante la espermatogénesis	13
1.4. Función epididimaria y formación de SOR	16
1.5. El almacenamiento prolongado y la sobrevivencia de espermatozoides en epidídimo del murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i>	18
2. Justificación	21
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	22
5. Material y métodos	23
5.1. Material biológico	23
5.1.1. Captura y selección de los murciélagos	23
5.2. Trabajo de laboratorio	24
5.2.1. Reactivos y soluciones	24
5.2.1.1. Reactivos	24
5.2.1.2. Soluciones y medio de incubación	25
5.2.2. Preparación de los tejidos post-descongelación	26
5.2.3. Determinaciones bioquímicas	26
5.2.3.1. Cuantificación del contenido de proteínas totales	26
5.2.3.2. Cuantificación de las enzimas antioxidantes	27
5.3. Análisis de resultados	29
6. Resultados	30

6.1. Características somáticas (peso corporal y longitud del antebrazo) de los murciélagos capturados durante su ciclo anual.	30
6.2. Variación interanual del peso testicular y epididimario en el <i>Corynorhinus mexicanus</i>	31
6.3. Cuantificación del contenido de proteínas totales en los órganos reproductores	34
6.4. Actividad específica de las enzimas antioxidantes en los órganos reproductores	37
6.4.1. Superóxido dismutasa	37
6.4.2. Catalasa	40
6.4.3. Glutación peroxidasa	43
7. Discusión y conclusión	44
8. Bibliografía	49

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los estudios que se han realizado en el campo de la reproducción, la protección de los espermatozoides en contra del estrés oxidativo es un aspecto en el que aún queda mucho por estudiar, pues a pesar de que se ha propuesto como principal mecanismo de protección celular a la actividad de las enzimas antioxidantes *superóxido dismutasa* (SOD), *catalasa* (CAT) y *glutación peroxidasa* (GPX), en las células sexuales masculinas, aún nada está comprobado. En el presente trabajo se estudió la participación de SOD, CAT y GPX, en testículo y epidídimo, como mecanismo de protección de los espermatozoides en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, un caso particular donde el tiempo entre que son formados hasta el momento previo a la eyaculación es largo, algo inusual en los mamíferos.

1.1 Substancias reactivas de oxígeno (SRO) y sus implicaciones sobre la estructura y función de los espermatozoides.

Las SRO tienen gran importancia en lo referente a la reproducción, ya que su participación está involucrada en una gran cantidad de procesos. Sin embargo en este capítulo solo se va tratar a lo relativo a los espermatozoides.

Uno de los procesos más importantes que afectan la viabilidad de los espermatozoides, desde el periodo en que son producidos por el testículo, durante el tiempo que deben permanecer en el conducto epididimario para su maduración, y aún después cuando son inseminados en el tracto genital femenino, donde son capacitados para realizar la fertilización, es aquel en donde su integridad estructural y potencial funcional se ven alterados debido al estrés oxidativo causado por diversas SRO; algunas de esas, conocidas como radicales libres.

Para definir a un radical libre es necesario explicar algunos aspectos relacionados a los electrones y específicamente a la configuración de estos en toda sustancia (elemento o molécula). Los electrones son partículas subatómicas con carga negativa que se encuentran presentes en torno al núcleo dentro de orbitales. Cada uno puede contener un máximo de dos electrones y cuando el orbital se encuentra lleno, los electrones que forman el par deben tener giros (spin) opuestos para anular recíprocamente su campo magnético. Si en un orbital hay un sólo electrón se dice que no está apareado. Cuando un átomo o molécula tiene uno o más electrones desapareados recibe el nombre de *radical libre*. Los radicales libres suelen ser muy inestables, pues los orbitales que poseen electrones desapareados buscarán con avidez completar el par electrónico que anule su campo magnético, favoreciendo la colisión entre las moléculas y su aproximación a ellas, razón por la cual las reacciones en las que intervienen suelen ser muy rápidas. Estas reacciones pueden darse entre dos radicales, donde ambos dejarían de serlo o pueden robar electrones de moléculas vecinas formando nuevos radicales, donde en la mayoría de los casos se inicia una serie de reacciones en cadena.

Un radical libre que merece especial atención es el llamado *anión superóxido* (O_2^-), por su alta reactividad y su capacidad para generar nuevas SRO. El *anión superóxido* es producido por la reducción monovalente del oxígeno molecular (O_2). Otro radical de gran importancia por su alta reactividad es el *ion hidroxilo* (OH^\cdot) generado tras la captación de un electrón y un protón por parte del *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2). Por su parte, el H_2O_2 si bien no es un radical libre, es considerado también como una SRO pues se produce fundamentalmente por la dismutación del anión superóxido. Estas tres especies formadas a partir de la reducción del oxígeno son algunas de las llamadas SRO (Figura 1), mismas que tienen su origen en fuentes fisiológicas, entre las que se encuentran, la cadena respiratoria mitocondrial, donde entre el uno y dos por ciento de la reducción del oxígeno a agua en la cadena respiratoria se libera como

O_2^- . Otras de las vías son: la fagocitosis, reacciones de desintoxicación, síntesis de prostaglandinas, etc.

Estudios realizados en epidídimo reportan, que los espermatozoides son capaces de producir SRO, observándose que la producción de SRO obtenidas a partir de la región cefálica del epidídimo es similar a la que se encuentra en los espermatozoides de la región caudal (Finkel y Holbrook 2000; Vernet y col. 2001).

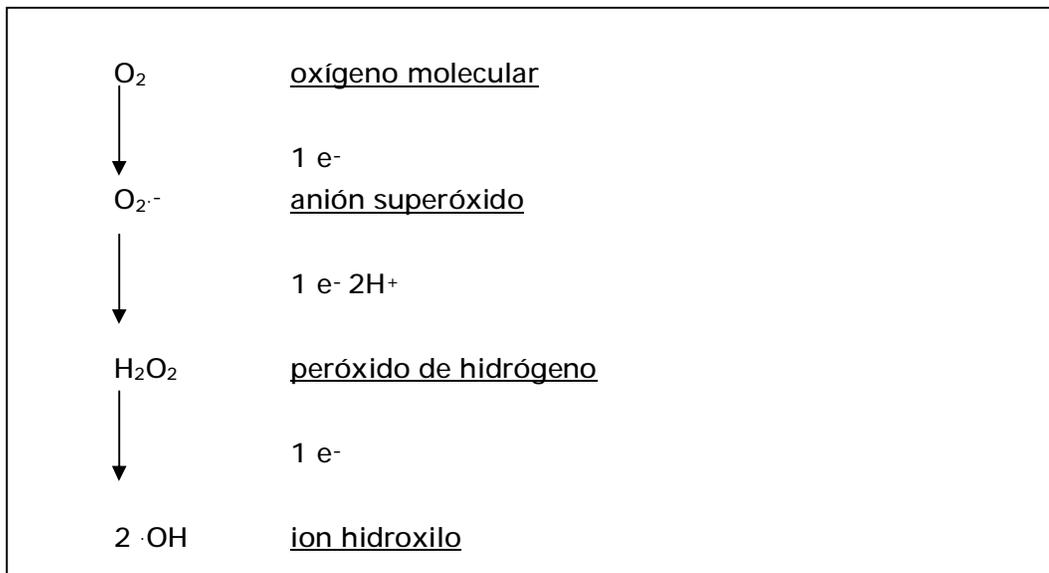
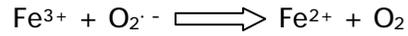


Figura 1. Nombre de algunas sustancias de oxígeno reactivas, y su formación de las mismas a partir del oxígeno molecular.

Durante mucho tiempo se ha sabido de la formación de radicales hidroxilos obtenidos por la reacción de Fenton (descrita desde 1894), su liberación se lleva a cabo cuando el peróxido de hidrógeno reacciona en presencia de metales de transición como el Cu^+ ó el Fe^{2+} , de acuerdo a la siguiente reacción:



Además, el radical anión superóxido alimenta la producción de Fe^{2+} y, por lo tanto, la reacción de Fenton, tiene lugar de la siguiente forma:



La dismutación del radical $O_2^{\cdot -}$ y del H_2O_2 , en un medio biológico que inevitablemente contiene hierro es muy peligrosa, ya que el radical OH^{\cdot} formado es un oxidante extremadamente reactivo que interactúa con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos a velocidades sólo limitadas por su difusión (Cuadro 1) (Halliwell y Gutteridge, 1984; Finkel y Holbrook, 2000).

<u>Tiempo de vida de las SRO</u>				
Sustancia	Símbolo	Tiempo de vida en seg. a 37°C	Potencial de reducción estándar (V)	
Oxígeno	O_2	$> 10^2$	-0.46	(-)oxidante
Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2	-----	0.32	↓
Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	1×10^{-6}	0.94	
Hidroxilo	$\cdot OH$	1×10^{-9}	2.31	

Cuadro 1. Tiempo de vida (segundos) y potencial de reducción estándar (volts) de los SRO, donde se observa que el tiempo de vida se correlaciona con del potencial de reducción estándar. Datos tomados de Halliwell y Gutteridge, (1984).

Cuando la interacción de las SRO con moléculas susceptibles a oxidación, excede a los sistemas de defensa, provoca un estado que se denomina *estrés oxidativo*. Este estado de estrés se produce al generarse una cascada de eventos intracelulares que pueden convertirse en un daño oxidativo grave que se puede manifestar por eventos como fragmentación del ADN, inactivación de enzimas e interacción con otras estructuras proteicas u oxidación de lípidos.

El proceso de oxidación de lípidos es denominado *lipoperoxidación*, afecta enormemente a las membranas biológicas debido al gran contenido que tienen de fosfolípidos y una importante proporción son conformados por ácidos grasos poliinsaturados, que son muy vulnerables a la peroxidación; esta vulnerabilidad se debe a que los enlaces dobles carbono-carbono debilitan la unión carbono-hidrógeno del átomo de carbono vecino. El radical OH^{\cdot} , al atacar los ácidos grasos insaturados, sustrae un átomo de hidrógeno y crea un nuevo radical, el cual es estabilizado por un rearrreglo interno que produce un dieno conjugado, que a su vez reacciona rápidamente con O_2 para dar un radical peroxilo (ROO^{\cdot}); este último puede atacar a un lípido vecino, sustrayendo un átomo de hidrógeno, para producir un hidroperóxido y un nuevo radical. Los hidroperóxidos lipídicos son estables en estado puro, pero en presencia de metales de transición se descomponen dando un radical alcoxilo. Tanto los radicales peroxilos como alcoxilos estimulan la reacción en cadena, al sustraer átomos de hidrógeno de otros lípidos.

Retomando el caso particular de los espermatozoides y debido a que estos contienen una gran cantidad de fosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas, son especialmente sensibles al daño por SRO, siendo el H_2O_2 la más tóxica para este tipo de células. Además, los lipoperóxidos y sus productos de degradación (malondialdehído, hidroxial-queñales, etc.) son altamente peligrosos por representar una forma de autotoxicidad, pues su efecto se traduce en alteración de

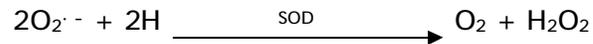
permeabilidad membranal y disminución de la movilidad. Grandes concentraciones de H_2O_2 inducen lipoperoxidación, causando muerte celular (Neil y col., 1992; Chen y col., 1997; Alva y col., 2000; Quintero y col., 2000). Niveles bajos de SRO no afectan gravemente la viabilidad de los espermatozoides, pero provocan su inmovilización y el daño irreversible de su filamento axial provocando una fosforilación insuficiente de las proteínas de este filamento lo que provoca una deficiente funcionalidad celular. Se han realizado estudios que comprueban que el H_2O_2 está involucrado en la regulación de la capacitación y la reacción acrosomal, siendo este benéfico en concentraciones relativamente bajas, pues promueve estos eventos, pero en concentraciones altas inhibe este proceso (Rivlin y col., 2004), lo que resalta la importancia de los mecanismos moduladores de estas SRO durante su estadía en el tracto genital masculino e impedir así una activación prematura de la capacitación y reacción acrosomal.

1.2 Sistema enzimático de protección en contra de las SRO

Dado que, en la mayoría de los casos los altos niveles de SRO pueden provocar la muerte de las células, los organismos aeróbicos cuentan con mecanismos de protección en contra del estrés oxidativo, estos pueden ser enzimáticos o de otra naturaleza, los cuales de manera coordinada protegen al organismo de la amenaza que conlleva la presencia de SRO. En este capítulo solo se tratan aquellos de naturaleza enzimática, entre estos se ha propuesto como de la mayor importancia el que depende de las ya mencionadas SOD, CAT y GPX (Pal, 1994).

Se han identificado cuatro clases de SOD: una de ellas contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu^{++} y otro de Zn^{++} . Las demás presentan cofactores mononucleares de Fe (FeSODs), Mn (MnSODs) o Ni. En las células eucariontes, pueden encontrarse en el espacio intramitocondrial, citosólico y extracelular. Esta

enzima cataliza, en todas sus variedades, la conversión de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y O_2 , en una de las reacciones más rápidas que se conoce.



La reacción depende de la difusión de $O_2^{\cdot -}$ y la cinética de colisión con los H, pero se ha encontrado que el campo eléctrico de SOD favorece 30 veces la velocidad de asociación del anión.

El espectro de absorción ultravioleta de la enzima muestra características no usuales con respecto al resto de las proteínas presentando su mayor absorbancia a 258nm en vez de a 280nm como es lo habitual, con la aparición de pequeños picos a 254nm, 260nm y 266nm. Esto se atribuye al efecto combinado de la composición de aminoácidos aromáticos peculiares de la proteína y al efecto hipercrómico producido por los átomos de Cu^{++} y Zn^{++} (García y col., 1997).

El catabolismo del H_2O_2 se realiza en dos diferentes maneras por CAT y GPX. A pesar de que CAT no es esencial para algunos tipos de células, se le puede localizar en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. En algunas especies CAT contiene moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado en su forma reducida (NADPH) ligadas estrechamente; por ejemplo, en el humano y en la res, CAT está ligada a cuatro moléculas de NADPH, una en cada subunidad y se ha visto que no existe interacción directa entre el grupo hemo y el NADPH. El NADPH puede intervenir en la prevención y reversión parcial de la inactivación de CAT por su propio sustrato tóxico y estabiliza a la enzima por tener un efecto sobre su conformación alostérica. Además, CAT constituye un reservorio de NADPH, lo cual juega un papel importante evitando el estrés oxidativo. Esta enzima se

caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa. Ambas se pueden representar mediante la siguiente ecuación:



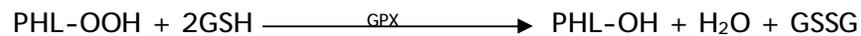
En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído. Esta función se puede realizar con mono, dí y tetrameros. La actividad de CAT puede ser inhibida por el cianuro, la azida, el sulfuro, la hidroxilamina, el paracetamol, la bleomicina, la adriamicina, la benzidina y el paraquat. En la función catalítica, el donador es otra molécula de H_2O_2 , función que sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica. (Céspedes y col. 1997).

Por su parte, GPX es una enzima Selenio (Se) dependiente que cataliza la reducción del H_2O_2 , pero también cataliza la reducción del lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente reductor, el glutatión (GSH). Se ha encontrado que los L-OOH son tóxicos en los tejidos animales y que dan lugar a especies reactivas del oxígeno como los radicales peróxido (L-OO*), compuestos indeseables para los organismos, pues al reaccionar se produce hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcoholóxidos, para los que no se conoce enzima que module su reactividad. Existen al menos tres formas de GPX: una forma intracelular (GPX-c), una extracelular o plasmática (GPX-p) y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPX-PH) que por lo general está asociada con las membranas, y aunque su actividad es la misma, poseen diferencias estructurales. GPX-c se puede localizar en la mitocondria y el citosol de la célula hepática, en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en lisosoma de

neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune. GPX-c y GPX-p catalizan la siguiente reacción:



Mientras que la reacción de GPX-PH es:



GPX-c tiene mayor afinidad por el H_2O_2 que por los L-OOH, en tanto GPX-p tiene una afinidad semejante para los dos sustratos. GPX-c y GPX-p utilizan como sustratos los H_2O_2 y los L-OOH; sin embargo, no son capaces de utilizar los fosfolipoperóxidos (PHL-OOH) que son los sustratos principales para GPX-PH.

En el centro activo de la enzima se encuentra un átomo de Se unido covalentemente a un residuo de cisteína con actividad durante la catálisis, además se describe en el centro activo un grupo tiol muy cercano al Se que proviene de un residuo de cisteína. En las diferentes formas de GPX se conserva casi intacta la estructura del centro catalítico, lo que refuerza la hipótesis de que el mecanismo de acción para las tres formas es el mismo. La formación del complejo enzima sustrato se produce debido a que en el sitio activo tienen lugar una serie de transformaciones como resultado de las cuales se forma un puente metálico cíclico.

Se ha observado que GPX y CAT no actúan en las mismas condiciones; CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y GPX lo hace en concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. Es conveniente hacer notar que algunas citosina, como el factor de necrosis tumoral

(TNF), el interferón (IFN) y la interleucina-1 (IL-1), son capaces de inhibir la actividad de GPX (Cisneros y col., 1997).

En estudios sobre la presencia de las enzimas CAT, SOD y GPX en el tracto reproductor de la rata, se ha encontrado que la concentración de GPX es mayor en testículo que en epidídimo y se ha visto que una isoenzima epidídima de GPX, solo fue expresada en la cabeza del epidídimo, sugiriendo que participa protegiendo a los espermatozoides durante su tránsito por este órgano (Vernet y col., 2001). En estudios realizados sobre la actividad de SOD y GPX revelan que hay diferencias significativas entre los espermatozoides obtenidos de la cabeza y de la cola de epidídimo de rata, siendo mayor la actividad de estas enzimas en la región de la cabeza (Godeas y col. 1997; Tramer y col., 1998). Por otro lado se ha encontrado que la actividad de CAT en cabeza de epidídimo es igual que en la cola de este órgano, mientras que la actividad de GPX y de SOD es mayor en cabeza que en cola de epidídimo (Tramer et al., 1998). Para el caso particular del testículo, en ratas se ha reportado que GPX solo es expresada después de la pubertad, relacionando la participación de esta enzima directamente con la espermatogénesis, pues se piensa que este proceso puede ser dependiente de Se, razón que justificaría las altas concentraciones de GPX en testículo de rata (Roveri y col. 1992). También se ha reportado, que en células de Sertoli y en células germinales se sintetiza o secreta SOD, que podría estar funcionando como un mecanismo mediador en contra de $O^{\cdot -}$ (Mruk y col., 1998).

Se ha determinado la presencia de las tres enzimas antioxidantes en semen de humano, encontrando que cuando estas se encuentran en concentraciones por debajo de las normales, la movilidad, la capacidad de reacción acrosomal y la viabilidad en los espermatozoides disminuye de manera recíproca con el aumento del índice de lipoperoxidación, siendo la actividad de estas enzimas uno de los elementos

principales en la protección de las células sexuales masculinas eyaculadas en contra del estrés oxidativo (Álvarez y col., 1987; Neil y col., 1992; Chen y col., 1997; Baumber J. y col., 2000; Quintero y col., 2000).

De este modo, la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX en la modulación de la amenaza peroxidativa que presentan las SRO hacia los espermatozoides como parte del componente masculino para la perpetuación de su especie, resulta muy importante.

1.3 Producción de SRO durante la espermatogénesis.

Los espermatozoides se forman en los testículos mediante la *espermatogénesis*, este se lleva a cabo en el revestimiento epitelial de los *túbulos espermáticos*, tubos muy largos, altamente contorneados, que comúnmente tienen 2 extremos plegados en asas con ambos extremos abriendo a la *rete testis*, estos, se encuentran separados por tejido intersticial y arreglado en lóbulos (Setchell y col., 1994).

La *espermatogénesis* se lleva a cabo como consecuencia de la estimulación por las hormonas gonadotróficas de la hipófisis, la *hormona foliculo estimulante* y la *hormona luteinizante*, esta última estimula la secreción de *testosterona* por medio de las *células de Leydig* que rodean a los *túbulos espermáticos*, los cuales están formados de células somáticas y células germinales. Entre las células somáticas se encuentran las *células de Sertoli*, siendo su presencia determinante para el desarrollo de las células germinales (tabla 2) y que se diferencian siguiendo etapas definidas de desarrollo para formar espermatozoides. En la parte inicial de la *espermatogénesis*, las células germinales inmaduras denominadas *espermatogonias* se dividen continuamente por mitosis para formar *espermatogonias B*, punto en el que estas células migrarán hacia las *células de Sertoli*, formando una relación persistente durante todo el resto del

desarrollo del espermatozoide. Algunas de las células hijas cesan su proliferación y se diferencian en *espermatoцитos primarios*, estas, entran en la división I de la meiosis produciendo dos *espermatoцитos secundarios*, los cuales sufren la división II de la meiosis produciendo cuatro *espermátidas*. Estas *espermátidas haploides* sufren luego la diferenciación morfológica a espermatozoides, proceso que se denomina *espermioogénesis* (Figura 2) (Setchell y col. 1994; Plant y Marshall, 2001; Cheng y Mruk, 2002).

<u>Función de las células de Sertoli</u>
<ul style="list-style-type: none">○ Sirven de soporte para las células germinales○ Nutren a las células germinales○ Participan en el movimiento de células germinales jóvenes○ Fagocitan las células germinales en degeneración y cuerpos residuales de los espermatozoides.○ Secretan fluido luminal y proteínas○ Forman barrera hemato-testicular○ Participan en la comunicación celular, a través de contacto directo y uniones estrechas.○ Previenen la pérdida de ABP, inhibina e inhibidores enzimáticos del compartimiento luminal.

Cuadro 2 Principales funciones de las células de Sertoli (Setchell y col., 1994; Syed y Hecht, 2001; Cheng y Mruk, 2002)

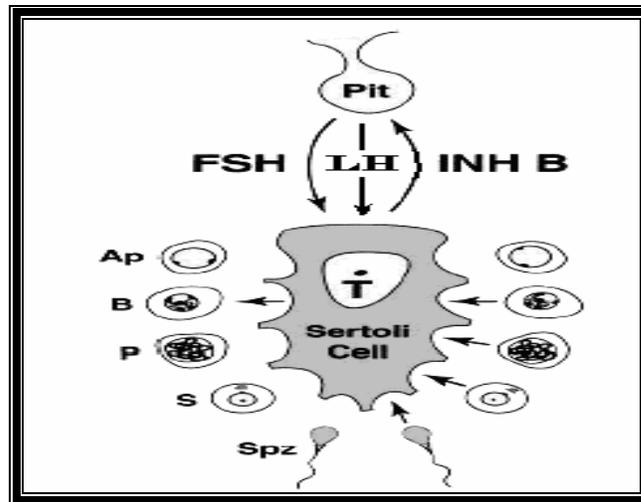


Figura 2 Modelo de regulación y producción de espermatozoides en primates. Tomada de: Plant y Marshall, 2001, donde: Pit- glándula pituitaria; INH B- inhibina B; FSH-Hormona foliculo estimulante; T-testosterona intratesticular; LH- Hormona luteinizante; B- Espermatogonias B; P- Espermatocitos primarios; S- Espermatidas redondas; Spz- Espermatidas alargadas y espermatozoides.

Los procesos implicados en la formación de los espermatozoides conllevan a una importante actividad metabólica, debido que las divisiones celulares resultan en una alta producción de biomoléculas necesarias, eso se traduce en un considerable gasto de energía que provoca la formación de SRO. En estudios realizados en rata, se encontró que existe una alta producción de estas moléculas oxidantes en espermatozoides inmaduros, siendo en la última etapa de la *espermiogenesis* más susceptibles a ser dañados por SRO (Gill-Guzman y col., 2001).

Se ha visto que durante la *espermatogénesis* normal en mamíferos hay una pérdida del 25-75% de las células germinales por *apoptosis*, observándose que este mecanismo de muerte celular programada, es regulado por un tipo de proteínas

conocidas como *proteínas FAS* (presentes principalmente en *células de Sertoli*), que a su vez son inducidas en respuesta a SRO (Koji y col., 2001).

Se tiene conocimiento de la presencia de estas enzimas en testículo, epidídimo, y en espermatozoides de rata, encontrándose que en testículo la actividad de SOD aumenta significativamente durante la maduración testicular, y se ha visto que su síntesis se lleva a cabo específicamente en las *células de Sertoli* (SOD extracelular) (Mruck y col., 1998). Además se ha observado que en este órgano la actividad específica de GPX-PH es notablemente alta (Godeas y col., 1997).

Los espermatozoides formados son pasados al epidídimo. Sin embargo las SRO producidas por espermatozoides inmaduros son la principal causa de daño para los espermatozoides maduros durante su migración al epidídimo (Gill-Guzman y col., 2001).

1.4 Función epididimaria y formación de SOR

El epidídimo, está constituido por un túbulo altamente contorneado que recibe el nombre de *conducto epididimario* (CE) se ha visto que en los mamíferos puede medir entre 3 y 80 metros (Heuze, 1992; Robaire y Viger, 1995), este conducto, se encuentra entre los conductos eferentes que lo unen al testículo y el conducto deferente.

Por sus características anatómicas y fisiológicas el epidídimo ha sido dividido en tres regiones principales que son: región cefálica o cabeza, región central o cuerpo y región caudal o cola, aunque cabe destacar que estas han sido divididas en diferentes segmentos de acuerdo a sus características celulares, diámetro del túbulo y área superficial del lumen (Taggart y Temple-Smith, 1989).

El epitelio epididimario está formado por diferentes tipos celulares, cada uno de los cuales se especializa en una función en particular, entre ellas se encuentran: la absorción, eliminación y secreción de fluidos, partículas y moléculas orgánicas, las cuales, debido a sus requerimientos de oxígeno y por su metabolismo normal, producen SRO (Robaire y Viger, 1995; Cooper 1999). Otra función del epitelio es el transporte de espermatozoides, durante el cual las células espermáticas deben mantenerse viables, aún cuando se sabe que están expuestas a SRO, que son formadas por la actividad metabólica del epitelio y por los propios espermatozoides (Cooper 1999; Vernet y col. 2001). La síntesis de proteínas es otra de las funciones de estas células y entre las proteínas que sintetizan se encuentran las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX (Godeas y col., 1997; Tramer y col., 1998). Sin embargo los componentes en el lumen cambian por diversos factores entre los que se encuentra la condición reproductiva.

El lumen del túbulo epididimario en etapas reproductivas, esta conformado de espermatozoides y fluido, cuya composición cambia desde el segmento inicial del epidídimo (región cefálica), hasta la región caudal del mismo, y se ha observado que la composición iónica, las moléculas orgánicas y las proteínas que tienen contacto con los espermatozoides a través del epidídimo, producen continuos cambios en los espermatozoides. Estos cambios están involucrados en la adquisición de la movilidad y su capacidad fertilizante, y conjunto forman parte de su maduración (Voglmayr y col., 1985; Hernández y Rosado, 1988; Huang y col., 1999; Legare y col., 2001).

Entre las principales funciones del epidídimo, se pueden citar la eliminación de espermatozoides defectuosos o muertos (Sutovsky y col., 2001), su maduración (Aitken y col., 1998; Lewis y Aitken, 2001) y el almacenamiento, entre la región cefálica, media y caudal.

Debido que la funcionalidad del epidídimo conlleva a una actividad metabólica que implica la producción de SRO, el almacenamiento de los espermatozoides en la cola del epidídimo debe estar acompañada de eficientes mecanismos antioxidantes de protección sobre todo si este almacenamiento se lleva a cabo por varios meses como sucede en el epidídimo de algunas especies de murciélagos.

1.5 El almacenamiento prolongado y la sobrevivencia de espermatozoides en epidídimo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

El murciélago *Corynorhinus mexicanus*, llamado comúnmente “murciélago orejado mexicano”, es una especie que habita las zonas mas altas y húmedas de los principales sistemas montañosos de México. Las hembras tienen una actividad reproductiva de tipo monoéstrica; mientras que en los machos existe una notable asincronía temporal entre las funciones reproductivas primarias y las secundarias, dándose la espermatogénesis en el verano y el máximo desarrollo de las glándulas accesorias y del epidídimo, libido y apareamiento durante el otoño (principalmente en noviembre) pero pudiendo prolongarse hasta la primavera, lo cual indica un almacenamiento de los espermatozoides en la cola del epidídimo de hasta cuatro meses (López, 1989; León y col., 1999). Durante el ciclo reproductivo anual de este murciélago pueden distinguirse con claridad importantes cambios morfométricos en los testículos y epidídimos en cuanto a su tamaño y peso, y es a través del seguimiento de esos cambios que el ciclo del desarrollo para cada tipo de órgano en el individuo adulto puede ser caracterizado en las siguientes etapas: I- reinicio del crecimiento, II- continuación del crecimiento, III- máximo desarrollo, IV- involución y V- arresto. Como ya se ha mencionado, cabe destacar que existe un desfasamiento temporal de las funciones reproductoras del macho en la especie de estudio, por lo que el momento

del año en que se presenta cada una de las etapas, así como su duración es diferente entre ambos órganos genitales (testículo y epidídimo).

Hay que resaltar que el fenómeno de almacenamiento prolongado de espermatozoides ya ha sido abordado por diversos investigadores desde el punto de vista histológico y bioquímico, encontrando que los espermatozoides en el epidídimo de algunas especies de murciélagos, son almacenados por varios meses, los cuales pueden presentar la reacción acrosomal retardada (Crichton y col., 1993), para lo cual existe una hipótesis que ayuda a comprender como es que los espermatozoides pueden mantenerse viables por tanto tiempo. Esta hipótesis se refiere al aumento de la osmolaridad en el lumen del túbulo en la cola del epidídimo, pudiendo prolongar la vida de los espermatozoides induciendo la deshidratación parcial (Crichton y col., 1994). Sin embargo, un estudio realizado en nuestro laboratorio con el murciélago *Corynorhinus mexicanus* en el tracto genital de las hembras, demostró que las secreciones que produce mantiene a los espermatozoides viables y con capacidad fertilizante durante largo tiempo, efecto debido a la capacidad de dichas secreciones de inhibir la lipoperoxidación (León y col., 1999).

Se propone que las enzimas SOD, CAT y GPX que son parte del sistema enzimático antioxidante de los organismos, son pieza fundamental del mecanismo de protección potencialmente susceptibles durante su desarrollo en el testículo y su almacenamiento en el epidídimo, procesos inusualmente largos en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. De manera concomitante, la protección de los espermatozoides en un ambiente libre de estrés oxidativo, propicia la extensión de su sobrevivencia y junto con un especial sistema de almacenamiento donde una alta selectividad en el transporte de sustancias a través de la membrana celular en el epitelio del túbulo

epididimario (mediante el desarrollo estacional de uniones estrechas) a semejanza de la barrera hemato-testicular (Noguchi y col., 2002), el ambiente hiperosmolar luminal del epidídimo (Crichton y col., 1994), hacen posible que los machos puedan desfasar su ciclo reproductivo con respecto al de las hembras para hacer coincidir primero el tiempo en que se lleva a cabo la espermatogénesis (la actividad energéticamente mas costosa de la reproducción en los machos) con el periodo del año de mayor abundancia en cuanto a disponibilidad de alimento (verano). En segundo termino, con el almacenamiento prolongado de espermatozoides, asegurar una reserva extragonadal de células germinales para el momento en que las hembras se encuentran receptivas para el apareamiento (otoño).

Este interesante patrón reproductivo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*, ofrece la oportunidad de estudiar la participación del sistema enzimático de defensa conformado por CAT, SOD, y GPX con que cuenta el organismo en contra de las ROS específicamente el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 . Siendo SRO una amenaza para el mantenimiento de la integridad estructural y la supervivencia de los espermatozoides cuando estos son almacenados en el epidídimo del *Corynorhinus mexicanus* durante el largo período de tiempo (de hasta 4 meses) desde que pasan a través de la *rete testis* del testículo a la cabeza del epidídimo, hasta el momento en que son depositados en el interior del tracto genital femenino durante la cópula; periodo que se extiende hasta varios meses después de que el testículo ha entrado en la fase de arresto espermatogénico.

Cabe mencionar que la revisión detallada de la literatura indica que no se ha realizado ningún estudio en esta, ni en otras especies que presentan los mismos mecanismos fisiológicos de reproducción y tiempo prolongado de almacenamiento espermático, que indiquen si la actividad de estas enzimas se modifica con los cambios observados en testículo y epidídimo durante el ciclo reproductivo anual. Por estas razones parece de

la mayor importancia determinar si la presencia y actividad de estas enzimas, son parte del sistema de defensa responsable del almacenamiento de los espermatozoides en la cola del epidídimo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

2. JUSTIFICACIÓN

Se conocen varios aspectos acerca de la funcionalidad y la participación de las enzimas CAT, SOD y GPX como mecanismo de protección de la viabilidad espermática después de la eyaculación. Sin embargo queda mucho por estudiar sobre los mecanismos de protección de los espermatozoides en contra de las SOR, durante procesos de espermatogénesis, maduración epididimaria, protección de la viabilidad y la movilidad durante el largo periodo de almacenamiento observado en algunas especies animales, pues se ha demostrado que el estrés oxidativo puede causar la inmovilización y la muerte de los espermatozoides. La presencia de SRO es inevitable ya que el metabolismo normal de las células genera estas moléculas tóxicas (aumento en las SRO = estrés oxidativo = muerte celular).

El estudio de la actividad de las enzimas CAT, SOD y GPX en una especie con las características reproductivas que presenta el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, puede dar información sobre la participación de las enzimas en estos procesos no solo en esta especie de animales, sino que, tomando en cuenta que la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides en epidídimo toma un tiempo considerable en prácticamente todas las especies de mamíferos (74 días en humanos), permitiría proponer la participación del sistema antioxidante enzimático permitiendo que los espermatozoides se mantengan viables durante este largo proceso antes de ser eyaculados. Estos hallazgos serían también de gran

utilidad por su posible aplicación en los sistemas de preservación espermática utilizados en los procesos de reproducción asistida.

3. HIPÓTESIS

Un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPX y CAT en testículo y las diversas regiones del epidídimo del murciélago *Corynorhinus mexicanus* coincide con la etapa en que el peso de estos órganos alcanzan su valor más alto.

4. OBJETIVOS

El caso del *Corynorhinus mexicanus* presenta un interesante modelo de estudio para precisar el papel que tiene cada una de las enzimas mencionadas en los procesos de espermatogénesis, maduración y el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides almacenados, y si existen diferencias temporales en la acción de las enzimas durante el tiempo del almacenamiento. Con este estudio se propone alcanzar los siguientes objetivos:

- Registrar los cambios morfométricos que ocurren en testículo y región cefálica y caudal del epidídimo de murciélagos adultos a través del ciclo anual.
- Cuantificar el contenido de proteínas a partir de extractos crudos de testículo, cabeza y cola de epidídimo, de murciélagos capturados con una periodicidad mensual durante un año.
- Cuantificar la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPX a partir de extractos crudos de testículo, cabeza y cola de epidídimo, en murciélagos capturados cada mes durante un año.

5. METODOS

5.1 Material biológico

5.1.1 Captura y selección de los murciélagos

Los murciélagos fueron capturados en la localidad conocida como "El túnel", localizada a 10 Kilómetros al este de Tlaxco, Tlaxcala; a 3320 metros sobre el nivel del mar (Figura 3), mediante un muestreo mensual durante un ciclo anual (2000-2001). Solo aquellos individuos con características de adulto fueron seleccionados, tomando como criterio: pelaje, peso corporal, longitud de antebrazo y condición de sus genitales externos.

Un total de 44 machos fueron usados. El peso corporal promedio fue de 7.53 g [7.2-8.0 g] y la longitud promedio del antebrazo fue de 41.86 mm [41.5 - 43 mm]. El peso fue registrado con una balanza electrónica portátil (± 0.1 g), mientras que las medidas fueron registradas con un bernier (± 0.1 mm).

Los animales fueron transportados vivos al laboratorio donde se sacrificaron por dislocación cervical. Se colocaron sobre su dorso, y se realizó una incisión ventral desde la región terminal del esternón hasta el hueso pélvico, para tener acceso amplio al tracto reproductor, se les extrajeron los testículos y los epidídimos. Para cada uno de los testículos se registró el peso húmedo, mientras que los epidídimos fueron separados en sus tres regiones gruesas (cabeza, cuerpo y cola), y de la región cefálica y caudal se registró el peso húmedo. El peso de los órganos y regiones reproductivas fue obtenido utilizando una balanza electrónica "Metler" (con precisión de 0.1 mg). Posteriormente los órganos fueron introducidos individualmente en tubos de polipropileno y congelados rápidamente introduciéndolos en nitrógeno líquido, para finalmente mantenerlos a preservados a -70° C hasta su utilización.

Mallinckrodt. Para la determinación de SOD se utilizó el Kit de superóxido dismutasa Ransod de laboratorios Randox.

5.2.1.2 Soluciones y medios de incubación

La solución de homogenización de tejidos fue HEPES 0.1M ajustado a pH 7.4. Para la determinación de proteínas se emplearon las siguientes soluciones: estándar preparado de albúmina sérica bovina (fracción V) en NaCl 0.9%; mezcla cuproalcalina consistente de: 5 g de Na_2CO_3 , 0.05 g de tartrato doble de Na y K, 1 g de NaOH y 0.25 g de sulfato cúprico en agua destilada previamente hervida para eliminar el CO_2 ; reactivo de Folín 1:3 en agua desionizada.

Para las reacciones enzimáticas se emplearon las soluciones siguientes: para el caso de la SOD se utilizaron 80 U/l de xantina oxidasa, solución del substrato mixto conteniendo xantina 0.05 mM, e I.N.T (cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio) 0.025 mM; todo ello preparado en una solución amortiguadora de CAPS 40 mM ajustada a pH 10.2 y EDTA 0.94 mM.

Para la determinación de CAT se emplearon etanol al 96%; tritón X-100 al 10%, H_2O_2 6mM (mantenido en frío y en oscuridad), H_2SO_4 6N, y KMnO_4 0.1N; para este sistema de reacción la solución amortiguadora fue Hepes 0.1M ajustada a pH 7.4.

En cuanto a la reacción con GPX se utilizó la siguiente mezcla de reacción conformada por glutatión reductasa a 120 u/ml, glutatión reducido 1.4mM, y NaN_3 0.15M, en solución amortiguadora (HEPES 0.1 M con EDTA 1 mM ajustada a pH 7.4), además se utilizó una solución de NADPH 1.5 mM y otra con H_2O_2 1.5 mM (mantenida en frío y en oscuridad).

5.2.2 Preparación de los tejidos post-descongelación

Los órganos fueron descongelados al momento de usarse para las determinaciones bioquímicas introduciéndolos en 10 volúmenes de solución previamente enfriada en hielo, de HEPES 0.1M, pH 7.4, a una proporción 1:10 P/V, en donde fueron homogeneizados con un barra de teflón en un homogeneizador glas-cool. Posteriormente el homogeneizado fue precipitado centrifugándolo a una velocidad equivalente a 10 000 g X 10 minutos, solamente el sobrenadante (extracto crudo fuente de enzima) fue empleado para los ensayos.

Debido a las características del ciclo reproductivo masculino del murciélago *Corynorhinus mexicanus* ya mencionadas, donde se presentan importantes cambios en el tamaño y peso de sus órganos reproductores de manera estacional, y por las necesidades de cubrir con la cantidad de tejido indispensable para la realización de cada una de las técnicas propuestas para algunas determinaciones, fue necesario reunir los tejidos de diferentes organismos, hecho que fue estipulado con ensayos previos en los que se utilizaron tejidos provenientes de órganos reproductores de ratón.

5.2.3 Determinaciones bioquímicas

5.2.3.1 Cuantificación del contenido de proteínas totales

El contenido de proteínas totales en los órganos reproductores fue calculado a partir de la determinación espectrofotométrica del producto de la reacción entre el sobrenadante (descrito arriba) y los componentes del sistema de reacción propuesto por Lowry, con las modificaciones descritas en Hartree (1972). Para este trabajo el sistema de reacción consistió de 3 pasos: 1) mezcla de 10 µl de sobrenadante con 190

μl de NaCl (0.9%) y 800 μl de mezcla cuproalcalina (0.01% Cu²⁺); 2) adición de 100 μl del reactivo folin (1:3); 3) cuantificación del producto de reacción en espectrofotómetro a 550 nm. Las soluciones realizadas en los pasos 2 y 3 fueron seguidas de agitación rápida en vortex y se permitió la reacción por 20 minutos a temperatura ambiente (22°C, ± 2). En cada determinación se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina como estándar; la curva fue realizada con 5 puntos de concentración ascendente entre 0 y 100 μg/ml. Tanto para las determinaciones en sobrenadantes como en la curva estándar las reacciones fueron hechas por duplicado

5.2.3.2 Cuantificación de las enzimas antioxidantes

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

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

El sistema de reacción consistió de 25 μl de sobrenadante, 850 μl de sustrato mixto y 125 μl de XOD, agitando con vortex después de adicionar cada uno de los reactivos, y su posterior cuantificación en el espectrofotómetro. Previo a cada determinación se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar de SOD (0-40U

SOD/ml) en amortiguador de fosfatos 0.01mol/l pH 7.0 y 850 µl de substrato mixto, más 125 µl de XOD.

Catalasa: la determinación de CAT fue realizada en un sistema de reacción conteniendo permanganato de potasio (KMnO_4) cuya coloración intensa fue registrada a 480 nm. La base de la técnica consiste en la disminución del color debido a la reacción de peroxidación provocada por H_2O_2 hacia el permanganato de potasio, y el mantenimiento del color por degradación del H_2O_2 en presencia de CAT (Cohen y col., 1970). Para ello, la enzima fue solubilizada y activada en el sobrenadante tratandola en frío con 1 µl de etanol (96%) y 5 minutos con triton X-100. Posteriormente a esto, las soluciones fueron diluidas 1:5 con HEPES 0.1M, pH 7.4.

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

Glutation peroxidasa: la GPX se determinó por el método de Mills (Paglia y Valentine, 1967), que se basa en la cuantificación espectrofotométrica del glutati6n (GSH) a una L.O. de 340 nm. El GSH es uno de los componentes del sistema de reacción por medio del cual la GPX en conjunto con la glutati6n reductasa (GPX/GR) modulan la amenaza del H_2O_2 convirtiéndolo en agua; por su parte, el GSH es oxidado al disulfuro GSSG. El sistema de reacción también requiere NADPH como donador de protones.

El sistema de reacción consistió de 50 µl de sobrenadante, 355 µl de mezcla de reacción; 50 µl de NADPH y 50 µl de H_2O_2 , este último se adiciono después de agitar en Vortex e incubar por 3 minutos a 25°C , por último se leyó a 340 nm.

5.3 Análisis de resultados

Los datos morfológicos registrados para los murciélagos (peso corporal y longitud de antebrazo), los datos de peso húmedo obtenidos del testículo y del epidídimo, y el peso húmedo de las diferentes regiones del epidídimo (cabeza y cola) fueron agrupados por mes y analizados para verificar el patrón de cambios durante el periodo inter-annual. Cada variable fue comparada mediante el análisis de una vía de *Kruskal-Wallis* para identificar las diferencias significativas entre grupos.

La actividad específica de cada una de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPX) que fueron obtenidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas descritas en la metodología, fueron agrupadas también de manera mensual y comparadas mediante la prueba de *Kruskal-Wallis* para revisar el patrón de cambios observados para cada enzima en los diferentes órganos reproductores durante el periodo inter-annual. Los diferentes análisis estadísticos fueron realizados en el programa *SigmaStat 2.0*.

6. Resultados

6.1 Características somáticas (peso corporal y longitud del antebrazo) de los murciélagos capturados durante el ciclo anual

Para ambas variables somáticas registradas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes meses del año (Peso corporal: $H=17.853$, $P>0.05$; Longitud del antebrazo: $H=4.819$, $P>0.05$) (figura 4).

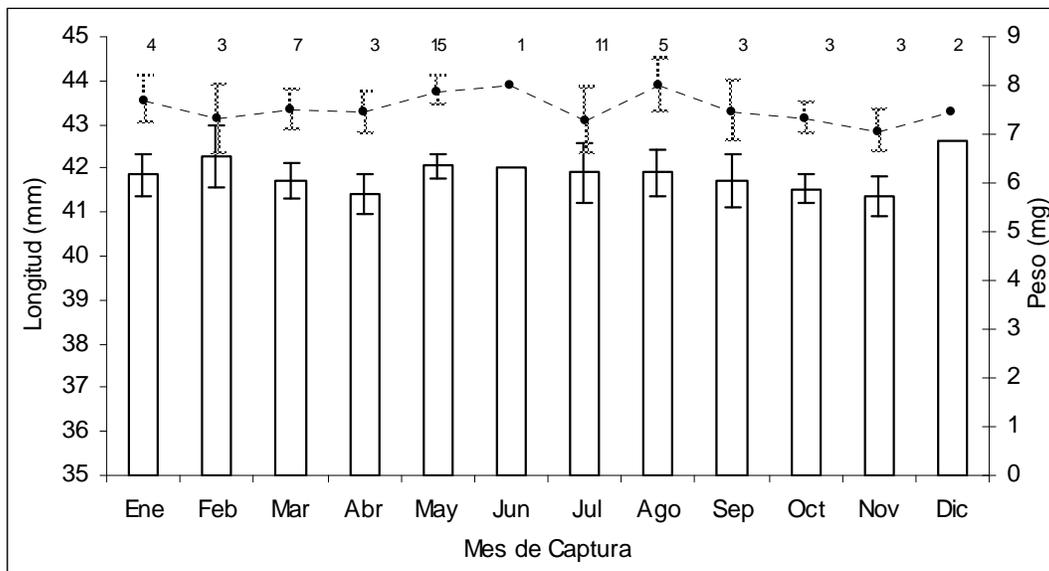


Figura 4 Variación mensual de la longitud del antebrazo y peso corporal de los murciélagos *Corynorhinus mexicanus* estudiados. Las barras representan el valor promedio de la longitud del antebrazo y las líneas punteadas el valor promedio del peso corporal. Las líneas muestran el error estándar, el número indicado en la parte superior del eje X representa el número de individuos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los meses, ni para la longitud del antebrazo (Kruskal-Wallis: $H=17.853$, $P>0.05$), ni para el peso corporal (Kruskal-Wallis: $H=4.819$, $P>0.05$).

6.2 Variación interanual del peso testicular y epididimario en el *Corynorhinus mexicanus*

La variación del peso testicular de los murciélagos mostró que los valores más bajos estuvieron presentes entre los meses de noviembre y abril, en mayo se registró un ligero pero significativo aumento que continuó hasta alcanzar un pico en agosto. Posteriormente ocurrió una pronta disminución del peso testicular entre septiembre y octubre (figura 5). Los cambios observados en la variación mensual del peso testicular fueron significativos con una $P < 0.001$.

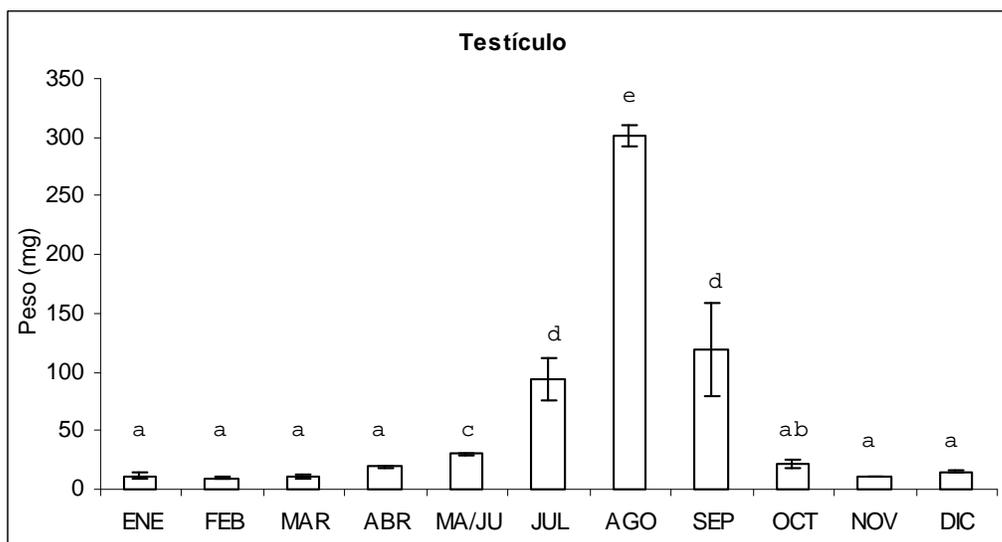


Figura 5 Variación del peso testicular mensual en el murciélago *C. mexicanus*. Las barras representan el valor promedio y las líneas el error estándar, donde n= los datos de 6 a 10 órganos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.001$. Los valores registrados para mayo y junio se reunieron en un grupo, después de comprobar que no existen diferencias significativas entre los valores de esos meses pero sí entre estos y los meses anteriores y posteriores.

Variación del peso de las diferentes regiones del epidídimo a través del año. Si bien para el estudio bioquímico no se utilizó la región media del epidídimo (cuerpo) debido a que generalmente presentó características de una región tubular muy estrecha y no era posible contar con la cantidad de material suficiente para llevar a cabo una determinación, en esta sección sí se reportan los cambios en peso de la región, junto con las regiones cefálica y caudal con la finalidad de tener una mejor comprensión de la dinámica de cambios ocurridos en el epidídimo. En general, la región caudal siempre fue la más pesada seguida de la cabeza y por último el cuerpo (figura 6). También se notó una dinámica de cambios con algunas diferencias en el reinicio del crecimiento sucesivo entre las diferentes regiones, comenzando por la cefálica, poco después el cuerpo y finalmente la cola; en lo que respecta a la etapa de regresión, la cabeza mostró una abrupta caída del peso en noviembre, la región intermedia (cuerpo) presentó característicamente una fase de transición, mientras que la cola también presentó una abrupta caída en noviembre pero de menor magnitud proporcionalmente a lo presentado en la cabeza (figura 6). En concordancia, los valores más bajos registrados para las tres regiones del epidídimo se presentaron entre marzo y julio, a excepción de la región corporal donde hubo un aumento desde junio. Así mismo, el mes donde fue alcanzado el máximo peso fue en octubre, dos meses después comparativamente con lo ocurrido con el testículo (figura 6).

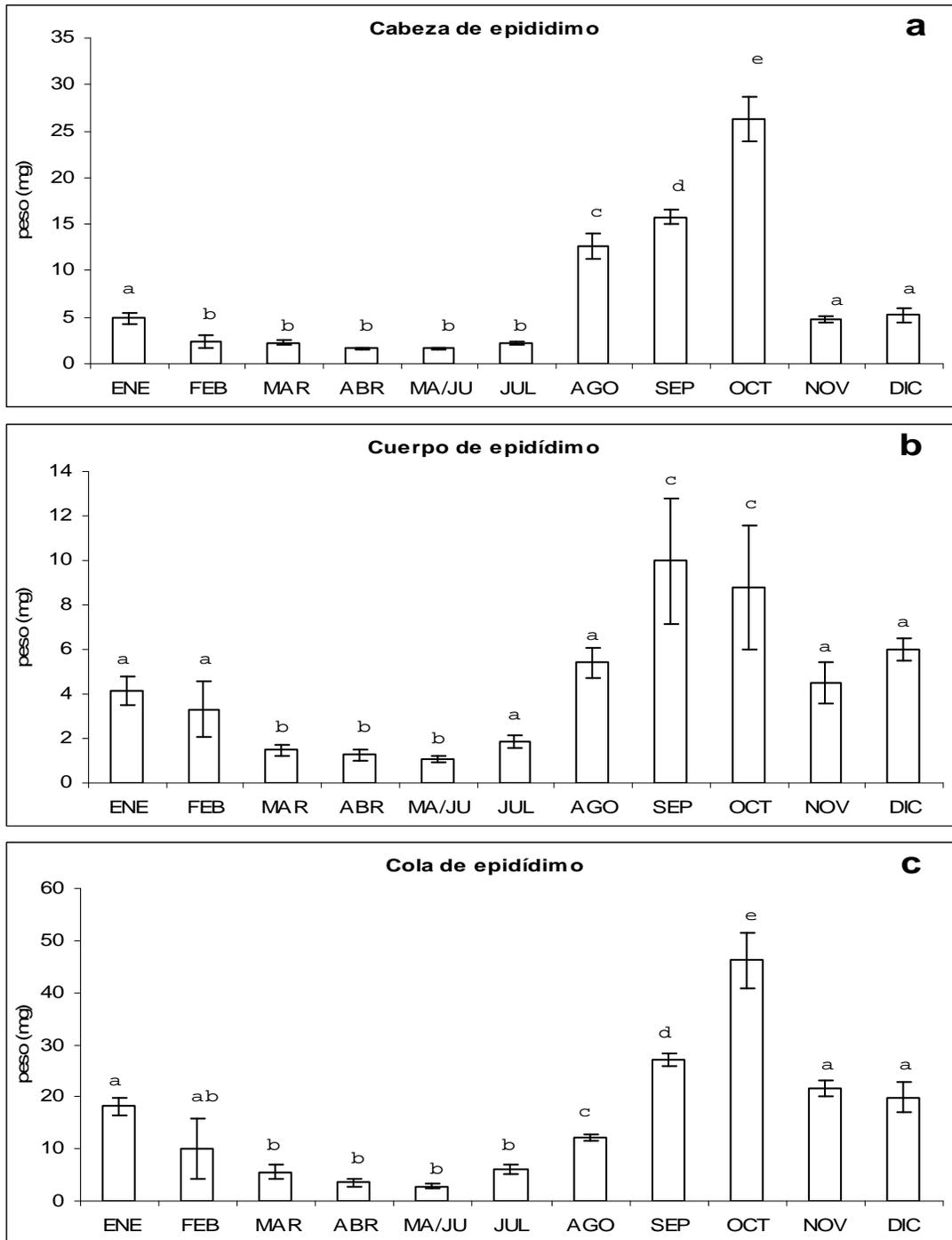


Figura 6 Variación mensual del peso para las diferentes regiones que conforman el epidídimo en *Corynorhinus mexicanus*; a) cabeza, b) cuerpo, c) cola). Las barras representan el valor promedio y las líneas el error estándar, n= las regiones de 6 a 10 epidídimos. Letras Diferentes indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.001$; los meses de mayo y junio se agruparon después de comprobar que no presentaron diferencias significativas entre ellos.

6.3 Cuantificación del contenido de proteínas totales en los órganos reproductores.

Previo a la determinación del contenido de proteínas totales en los extractos crudos de tejidos reproductivos, se realizó una curva de calibración de proteínas utilizando como estándar albúmina sérica bovina (figura 7), y a partir de esta, se observó que las determinaciones en el material biológico fueron adecuadas debido a que entraron en los parámetros especificados dentro de la curva estándar.

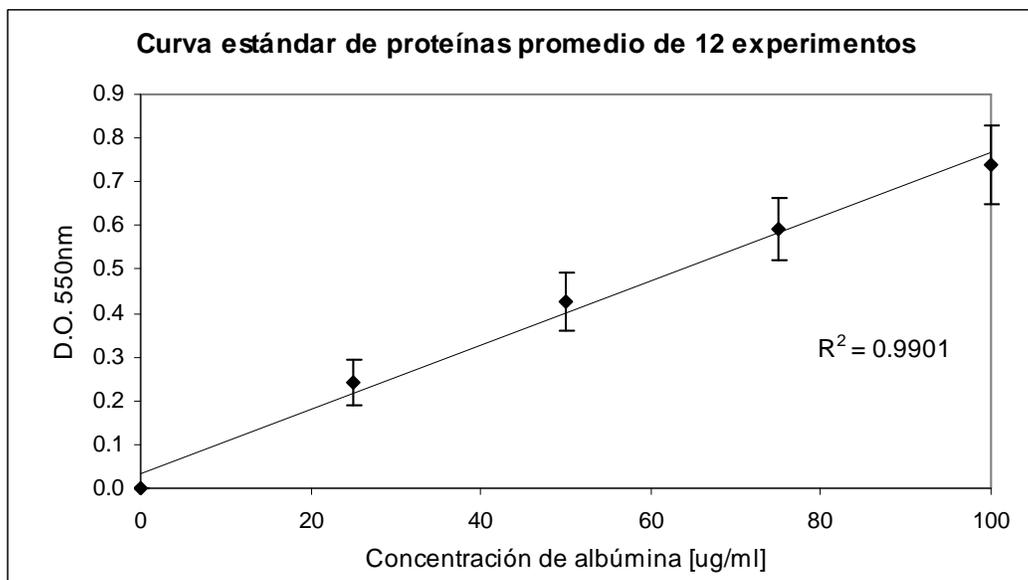


Figura 7. Curva de calibración para la determinación de proteínas totales en extractos crudos de tejidos reproductivos de murciélagos *C. mexicanus*. Cada punto representa la media de un valor conocido de concentración de albúmina sérica bovina y las líneas la desviación estándar con $n=12$ determinaciones. La línea que pasa por los puntos representa la correlación entre la D.O. y la concentración de proteínas, donde el coeficiente de correlación fue de 0.99.

Los resultados obtenidos para el contenido de proteínas totales en testículo, señalan que existen diferencias estadísticamente significativas cuando los datos se agruparon y compararon de manera mensual mediante la prueba de ANOVA. El contenido mas alto de proteínas en testículo fue registrado en enero, y en marzo, sin embargo debido a la amplia variabilidad en el contenido de proteínas entre órganos para este último mes, la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a los otros meses. La disminución en el contenido de proteínas testiculares comenzó a notarse a partir de abril, pero la disminución solo fue significativamente importante en julio y agosto, para posteriormente mantenerse en valores bajos hasta diciembre (figura 8a). Con respecto al epidídimo, también se registraron variaciones importantes entre los meses pero de manera diferente con respecto a lo observado en el testículo. Para la región de la cabeza se observó el valor significativamente mas elevado en julio con respecto a los demás meses del año (figura 8b). Finalmente, para la cola del epidídimo, si bien existen diferencias entre los valores mensuales en el contenido de proteínas totales, esas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 8c).

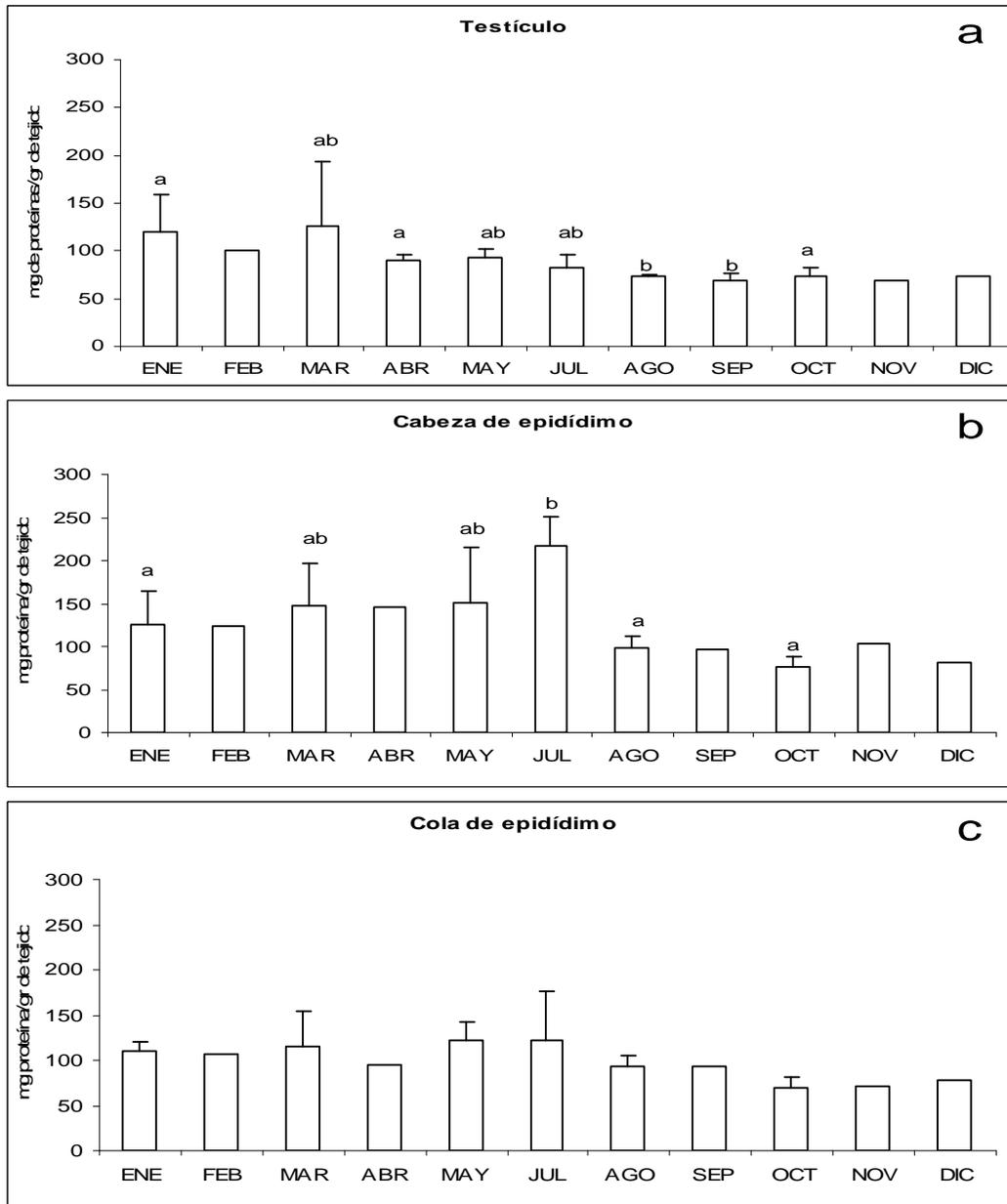


Figura 8 Variación mensual en el contenido total de proteínas expresado por unidad de tejido para los distintos órganos reproductores del murciélago *Corynorhinus mexicanus*; a) testículo, b) cabeza de epidídimo, c) cola de epidídimo. Las barras representan el promedio y las líneas el error estándar para n= los órganos de 2 a 5 murciélagos. Letras Diferentes indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.05$, excepto para la región caudal del epidídimo donde no hubo diferencia significativa entre meses (Kruskal-Wallis: $H = 17.50$, $P > 0.05$). Los valores para los meses de Mayo y Junio se conformaron en un solo grupo, después de comprobar que no existen diferencias significativas entre ambos.

6.4 Actividad específica de las enzimas antioxidantes en órganos reproductores

6.4.1. Superóxido dismutasa

La actividad de la enzima SOD en los órganos reproductores murciélagos *Corynorhinus mexicanus* fue calculada a partir de los datos de densidad óptica resultantes de la cuantificación espectrofotométrica del producto del sistema de reacción como fue descrito en la metodología para la SOD, y concentración en el sistema a partir de la elaboración de una curva estándar (figura 9), seleccionando aquellas muestras cuyos valores estuvieron comprendidos entre el 30 y el 70 % del porcentaje de inhibición de la reacción. Finalmente, la actividad específica de SOD fue calculada con respecto a la unidad de proteínas (AE) para cada órgano reproductor.

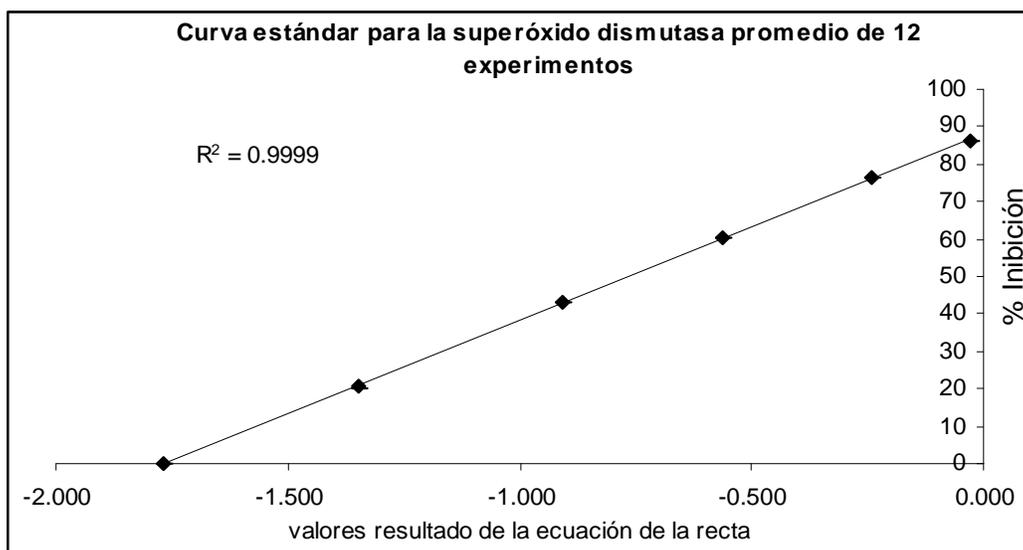


Figura 9. Curva estándar de actividad SOD. En el eje Y se indica el porcentaje de inhibición de SOD, mientras que en el eje X se indica $y = mx + b$ (donde $y = \log_{10}$ (U SOD); $m =$ pendiente; $x =$ % Inhibición; $b =$ ordenada al origen). Cada punto representa la media de 12 determinaciones, las líneas la desviación estándar (aunque no se alcanzan a ver por ser muy pequeña). La línea que pasa por los puntos indica la correlación existente entre ambas variables el cual es alto ($R = 0.99$).

La actividad específica de SOD registrada para el testículo fue proporcionalmente menor con respecto a la actividad registrada para las regiones del epidídimo analizadas, donde la magnitud en la actividad de esta enzima fue similar entre ambas regiones epididimárias. Por otra parte, se registró una fluctuación importante entre los meses en cuanto a la actividad específica de SOD para cada uno de los órganos reproductores analizados, observando un patrón estacional, que coincidió con el periodo del año donde se registraron los valores más altos para todos los órganos (marzo a julio). Los cambios registrados de manera particular para cada órgano reproductor están descritos en la figura 10.

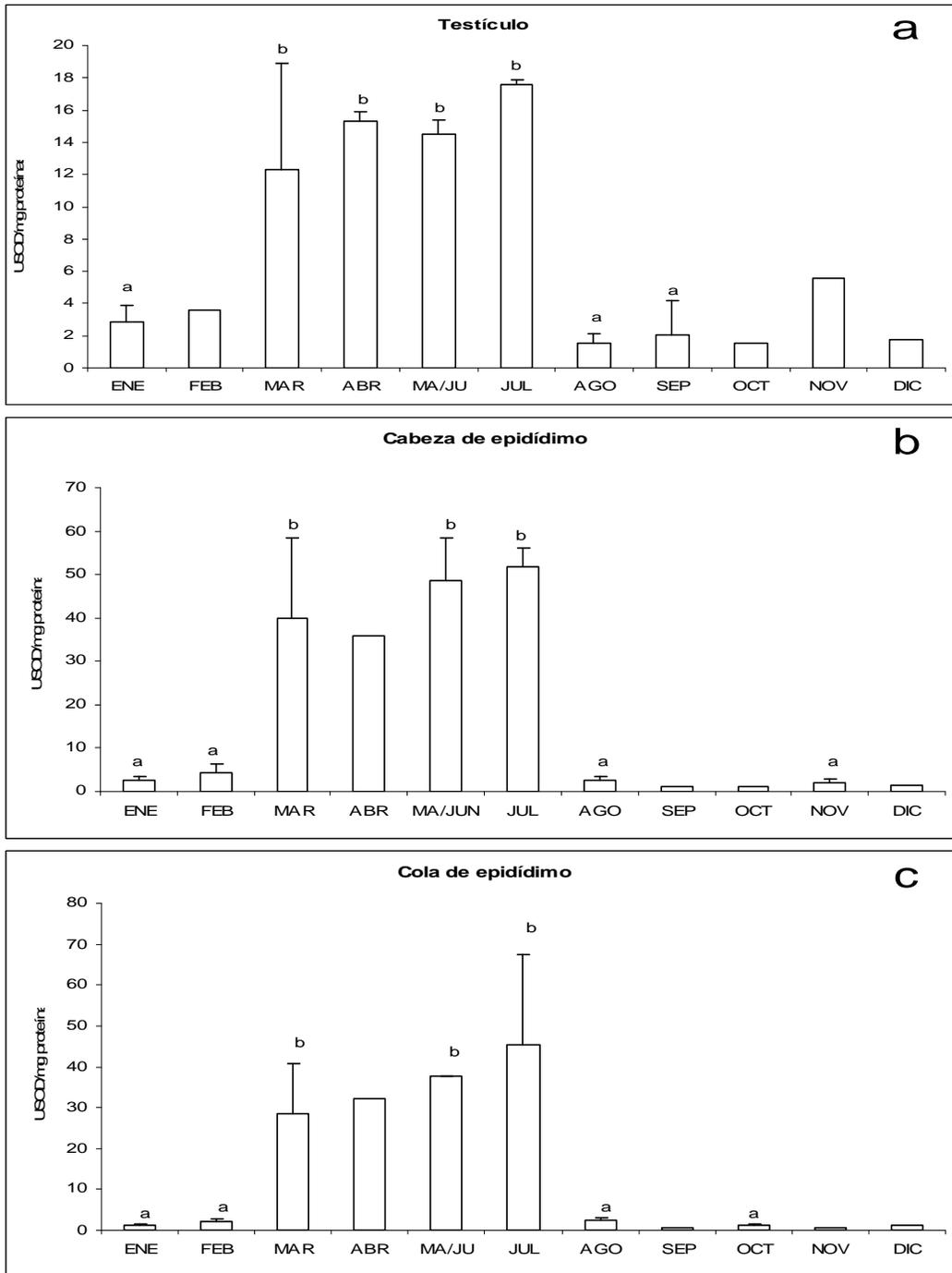


Figura 10. Variación mensual en la actividad específica de SOD en los diferentes órganos reproductores de murciélagos *Corynorhinus mexicanus*; a) testículo, b) cabeza de epidídimo, c) cola de epidídimo. Cada barra representa al valor promedio y las líneas la desviación estándar, para n= los órganos de 2 a 5 murciélagos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas a $P < 0.05$. Mayo y Junio se reunieron en un grupo, después de comprobar que en ningún caso existieron diferencias significativas.

6.4.2. Catalasa

Los valores de actividad específica registrados para los diferentes órganos reproductores del murciélago *Corynorhinus mexicanus* fueron similares en promedio, pero para cada órgano se registró una variación fluctuante entre los meses a lo largo del año, aunque solo para el caso del testículo esa variación presentó diferencias estadísticamente significativas. Para el testículo si bien existen algunos meses con valores inusualmente elevados (febrero, septiembre, diciembre), el comportamiento de los datos mensuales parecen indicar la siguiente dinámica para CAT; agosto presentó el valor mas bajo de actividad enzimática, los cambios en los meses posteriores no son muy claros pero podrían indicar un aumento de actividad gradualmente hasta alcanzar un máximo entre enero-febrero, y finalmente un claro y lento descenso de marzo a agosto (figura 11).

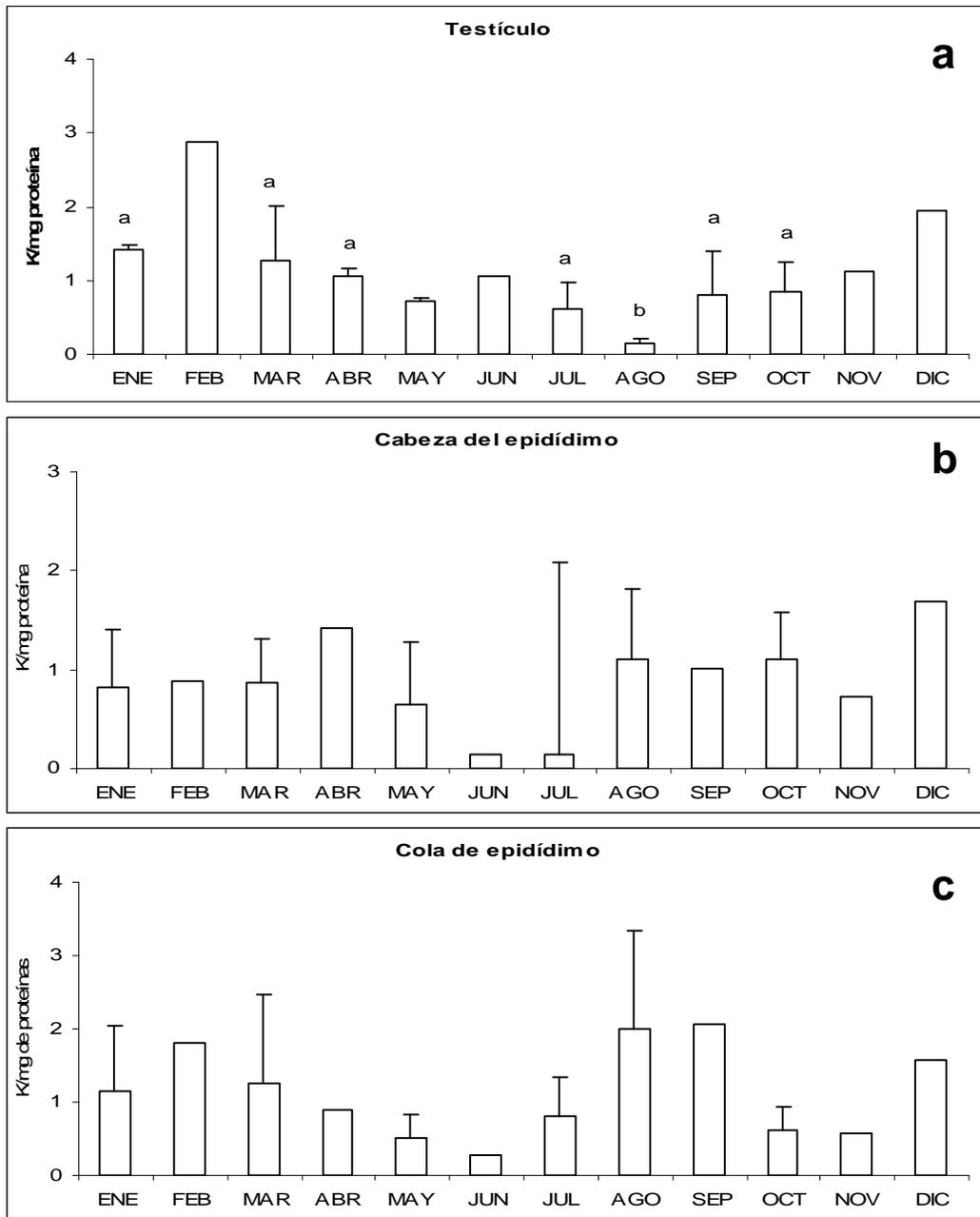


Figura 11. Variación mensual en la actividad específica de CAT en los diferentes órganos reproductores de murciélagos *C. mexicanus*; a) testículo, b) cabeza de epidídimo, c) cola de epidídimo. Cada barra representa el valor promedio y las líneas la desviación estándar, para n= los órganos reproductores de 2 a 5 murciélagos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de ANOVA a $p < 0.05$, excepto para cabeza y cola del epidídimo. (Kruskal-Wallis: Cabeza $H = 7.149$, $P > 0.05$; Cola $H = 7.139$, $P > 0.05$). Mayo y Junio se reunieron en un grupo, después de comprobar que en ningún caso existieron diferencias significativas.

6.4.3. Glutation peroxidasa

Los valores promedio registrados para la actividad específica de GPX en los diferentes órganos reproductores del murciélago *Corynorhinus mexicanus* indican que en algunos meses del año, los valores entre órganos son similares, mientras que para otros meses del año, particularmente para octubre, noviembre y diciembre, el testículo presenta valores mayores con respecto a los valores de actividad enzimática para las dos diferentes regiones del epidídimo estudiadas. La variación mensual en la actividad específica de GPX en cada uno de los órganos reproductores presentó diferencias estadísticamente significativas, pero de manera particular, el periodo del año donde los valores fueron significativamente más bajos coincidió para los tres tipos de órganos, en los meses de abril a julio (figura 12). Para el testículo, se registró un aumento gradual en la actividad específica de GPX a partir de agosto, para alcanzar un máximo en noviembre y posteriormente comenzar el descenso en la actividad hasta llegar a una condición prácticamente imperceptible con el método empleado en este estudio, en el mes de abril (figura 12a). De manera similar, para ambas regiones del epidídimo, cabeza y cola, un periodo de elevada actividad enzimática GPX fue registrado de agosto a diciembre, y un periodo ligeramente menos alto entre diciembre y marzo (figura 12a, b).

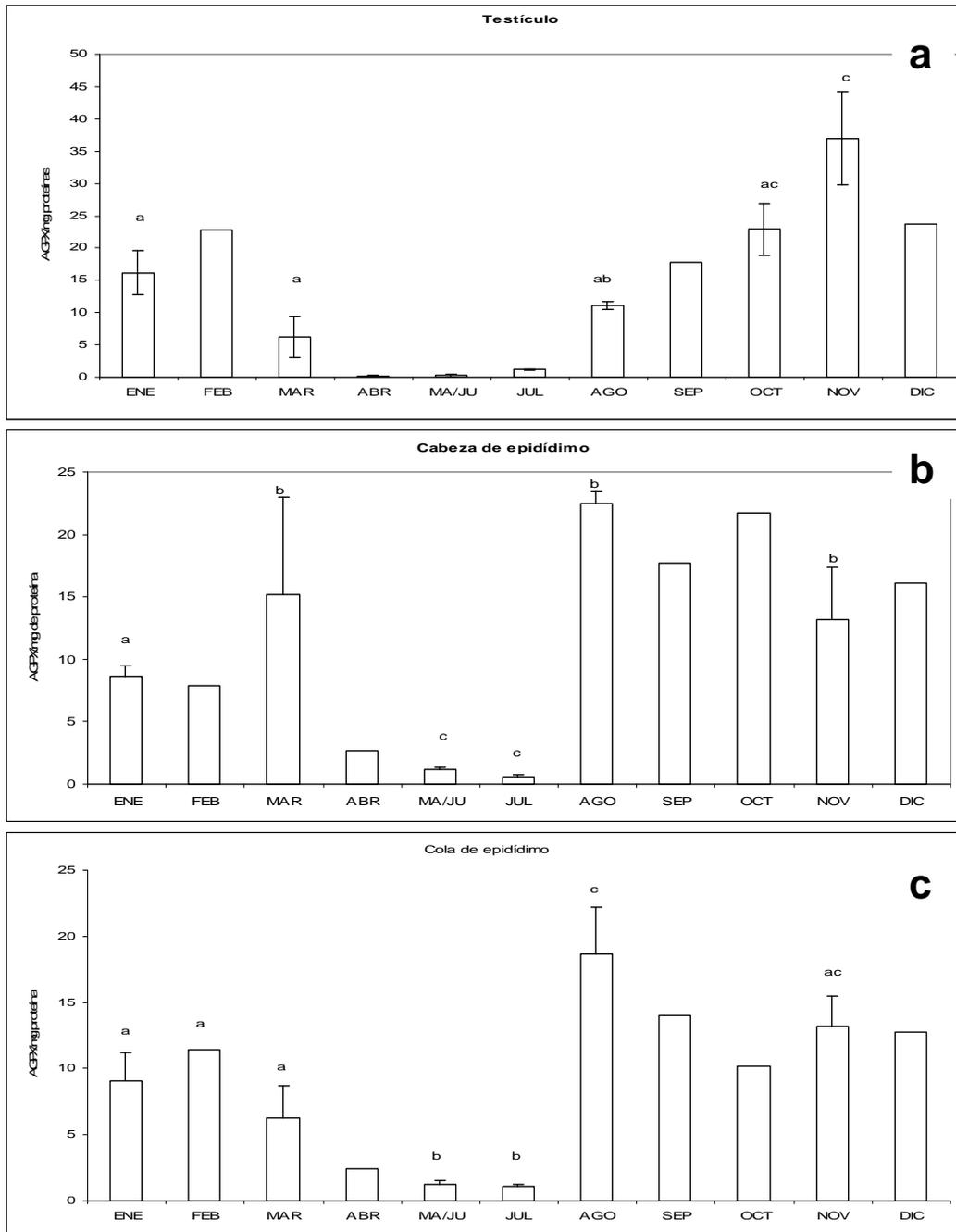


Figura 12. Variación mensual en la actividad específica de glutatión peroxidasa en los diferentes órganos reproductores de murciélagos *C. mexicanus*; a) testículo, b) cabeza de epidídimo, c) cola de epidídimo. Cada barra representa el promedio y las líneas la desviación estándar, para $n =$ los órganos de 2 a 5 murciélagos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante ANOVA a $p < 0.05$. Mayo y Junio se reunieron en un grupo, después de comprobar que en ningún caso existen diferencias significativas.

7. Discusión y conclusión

De acuerdo con lo reportado para el murciélago *Corynorhinus mexicanus* (López, 1989) y para otras especies de murciélagos (Krutzsch y Crichton 1987; Krishna y Singh 1997; Kurohmaru y col. 2002) que presentan un solo ciclo reproductivo al año, existen importantes cambios morfológicos en los órganos sexuales, pues estos aumentan su tamaño en etapa reproductiva e involucionan en etapa de inactividad reproductiva, habiendo un desfase entre testículo y epidídimo. No obstante, no se han realizado estudios ni en esta, ni en otras especies con las mismas características reproductivas, que responda ¿que es lo que estaría disparando la síntesis de proteínas al aumento del tamaño en los órganos? y ¿sí es la apoptosis, el mecanismo por el cual mueren las células cuando los órganos involucionan?, pues aun cuando los resultados en el peso, obtenidos en este trabajo no correlacionan con la concentración de proteínas determinado (*testículo*: $r=-0.0722$; *cabeza de epidídimo*: $r=-0.0724$; *cola de epidídimo*: $r=0.0125$), esto podría deberse a que la concentración de proteínas está expresada por miligramo de tejido. En estudios histológicos y hormonales realizados en otras especies de murciélagos que presentan características reproductivas similares al *Corynorhinus mexicanus*, se observa que existe una correlación positiva entre el aumento del peso, la actividad espermatogénica y el nivel de andrógenos en suero (Krutzsch y Crichton 1987; López 1989; Krishna y Singh 1997; Kurohmaru y col. 2002), por lo tanto y de acuerdo a los resultados obtenidos del peso en los órganos y la fecha de captura, estos, presentan cambios de manera estacional, que para fines descriptivos en este trabajo los hemos dividido en las siguientes etapas: involución (*testículo*: Enero-Abril; *epidídimo*: Febrero-Julio), aumento de la actividad (*testículo*: Mayo-Junio; *epidídimo*: Julio-Agosto), máximo de la actividad (*testículo*: Agosto; *epidídimo*: Octubre), inicio de la involución (*testículo*: Septiembre; *epidídimo*: Noviembre) y arresto (*testículo*: Octubre; *epidídimo*:

Marzo). Así, la etapa de máximo de actividad en testículo coincide con la etapa de inicio de actividad en epidídimo y la de máximo de actividad en epidídimo coincide con la etapa de arresto en testículo, lo que implicaría: por un lado, que existe un desfazamiento entre funciones testiculares y epididimarias, apoyando lo reportado para otras especies de murciélagos (Kruttsch y Crichton 1987; Krishna y Singh 1997; Kurohmaru y col. 2002) y por otro, que meses después de terminada la actividad espermatogénica los espermatozoides se estarían almacenando en el epidídimo, lo que sustentaría lo reportado por León-Galván (1999), donde menciona que en esta especie se presenta almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo de hasta por cuatro meses.

La actividad de las enzimas estudiadas en este trabajo, presenta notables cambios a través de su ciclo anual, pero ya que estos cambios en la actividad no correlacionan con la concentración de proteínas obtenidos en estos órganos, a excepción de SOD en testículo ($r=0.6995$), esto podría ser indicativo de que solo esta enzima y en este órgano, podría llevarse acabo la síntesis de *novo* en etapas de mayor actividad, pues además, los valores más altos encontrados para la concentración de proteínas, se encuentran en meses previos (Enero- Marzo), a que esta enzima alcance sus valores de mayor actividad (Marzo-Julio), además de que la concentración de proteínas no disminuye de manera significativa antes del mes de Julio, un mes antes de que la actividad enzimática en testículo alcance sus valores más bajos.

Como ya se ha mencionado en los antecedentes, la actividad de estas enzimas ya ha sido medida en epidídimo de rata (Tramer y col., 1999), en estos estudios se ha visto, que la actividad de SOD y GPX resulta mayor en la región cefálica con respecto a la región caudal, pero no así la actividad de CAT, pues no se presentan diferencias entre las dos regiones. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la actividad de SOD y GPX, no corresponde con lo reportado para rata, pues no se

encontraron diferencias de actividad entre ambas regiones, no obstante la actividad de CAT confirma en esta especie lo reportado para rata.

Por otro lado la actividad de SOD resulto tres veces mayor en epidídimo con respecto a lo encontrado para testículo, esto nos lleva a suponer, que esta enzima resulta ser de mayor importancia en el primero de los órganos mencionados, esta importancia podría justificarse con lo reportado por Vernet y colaboradores (2001), donde mencionan que en espermatozoides obtenidos a partir de epidídimo se genera una gran cantidad de O_2^- , producto de la actividad mitocondrial, proceso en el cual SOD resulta primordial para su protección. En el caso de CAT no se presentaron diferencias en la AE entre los órganos, pero no así para GPX en el que se observo el doble de actividad en testículo con respecto a epidídimo, estos resultados corresponden con lo reportado para ratas (Zini y Schlegel, 1997; Ursinil y col., 1999), donde la actividad de GPX es menor en este órgano con respecto a lo registrado para testículo, esto se explica para rata por Roveri y colaboradores (1992), donde se ha observado que GPX resulta ser la peroxidasa que se encuentra en mayor concentración en testículo, ya que se menciona que la espermatogénesis podría ser dependiente de selenio. Sin embargo los resultados encontrados de actividad de esta enzima, resulto ser mínima entre los meses de Abril a Julio, meses en los cuales en el testículo del murciélago *Corynorhinus mexicanus* inicia y evoluciona la espermatogénesis.

La correlación positiva que existe, entre el aumento del peso de los órganos reproductores, la actividad espermatogénica y el nivel de andrógenos en suero (Krutzsich y Crichton 1987; López 1989; Krishna y Singh 1997; Kurohmaru y col. 2002), nos permite usar los datos del peso, como una medida de la funcionalidad de estos órganos particularmente en cuanto a la producción de espermatozoides, por eso fue

de gran importancia conocer la correlación entre la actividad de las diferentes enzimas en los diferentes meses del año y la dinámica de cambios en el peso de los órganos. Para el caso de CAT y SOD entre la actividad enzimática y el peso de los mismos, el índice de correlación fue negativo. Sin embargo entre la actividad enzimática de GPX y la dinámica de cambios de cabeza y cola de epidídimo, se obtuvo una correlación positiva en ambas regiones, siendo alta en el primero de los órganos mencionados (Cabeza: $r=0.6041$; Cola: $r=0.350$). Además, de que el máximo de actividad de SOD en testículo y las diferentes regiones del epidídimo y CAT para testículo, coinciden con los meses en que los órganos presentan sus valores más bajos en peso, de este modo la participación de SOD parecería ser, justamente el no presentar actividad enzimática en etapas en las que los diferentes órganos presentan mayor actividad, de ese modo no se incrementaría el nivel de O_2^- en el medio, afectando así a las células espermáticas. CAT parece estar participando de manera conjunta con SOD en la protección del órgano en etapas de inactividad testicular, pues los meses en los que se presenta el máximo de actividad de SOD coinciden con el máximo de actividad de CAT. Sin embargo, el índice de correlación entre la actividad de estas enzimas, aunque es positivo resulta muy bajo ($r=0.067$). El mínimo de actividad de GPX en testículo, se presenta justo antes de que el órgano alcance su máximo peso y aumenta su actividad cuando el peso testicular presenta sus valores más altos. De este modo la actividad de GPX en testículo, podría estar directamente involucrada en la protección de las espermátidas y en la migración de los espermatozoides de los túbulos seminíferos, ya que, de acuerdo a Gil-Guzmán y colaboradores (2001) en estudios realizados en rata, las espermátidas en la última etapa de la espermiogénesis, son más susceptibles al daño inducido por las SOR, además de que estas moléculas oxidantes producidas por los espermatozoides inmaduros son la principal causa de daño para los espermatozoides maduros durante su migración. Tampoco se puede descartar la participación de GPX en la protección de las células testiculares debido a la pérdida de las células germinales en la espermatogénesis, ya que como se había

mencionado en los antecedentes, esta pérdida, esta dada por *apoptosis*, regulada por un tipo de proteínas conocidas como *proteínas FAS* (presentes principalmente en *células de Sertoli*), que a su vez son inducidas en respuesta a SOR (Koji y col., 2001).

La actividad de GPX en las diferentes regiones del epidídimo presenta sus valores más altos en los meses en los que la cabeza y cola del epidídimo presentan su peso más alto, además que de acuerdo con lo reportado por León-Galván (1997), en los meses en los que GPX presenta el máximo de su actividad coincide en la cola del epidídimo con la etapa de almacenamiento espermático. Por lo que esta enzima podría estar participando directamente en la protección de los espermatozoides en etapas de almacenamiento prolongado en el epidídimo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

En conclusión, no hay correlación entre la actividad de estas enzimas y el peso de los órganos, a excepción de GPX y la región caudal del epidídimo.

Las tres enzimas parecen ser importantes en las diferentes fases del ciclo anual del murciélago *Corynorhinus mexicanus* en testículo y epidídimo. Sin embargo la actividad de GPX parece ser la más importante, ya que en testículo, GPX aumenta su actividad cuando el peso testicular presenta sus valores más altos, pudiendo estar directamente involucrada en la protección de las espermátides y en la migración de los espermatozoides en contra del H_2O_2 , ya que según Gil –Guzman (2001), es la principal causa de daño para los espermatozoides maduros durante su migración. En epidídimo la actividad de GPX es alta durante los meses de almacenamiento espermático (León 1999), por esa razón nosotros postulamos, que GPX es necesaria para la protección de las células espermáticas en contra del H_2O_2 .

8. Bibliografía

- Aitken J., Gordon E., Haréis D., Twigg J., Milne P., Jennings Z. e Irvine S. (1998) Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59:1037-1046
- Alva Z. L.E., Monzón B.G., Peláez Y.L.A., y Quintero P.Y. (2000): Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Rev. Cubana Invest. Biomed* 19: 202-205.
- Alvarez J.G.; Touchstone J.C., Blasco L., y Storey B.T. (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectan against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8:338-348.
- Arthur J.R. y Boyne R. (1985), *Life Scien.* 36:1569-1575.
- Baumber J., Ball B., Gravance C. G, Meina V. y Davies-Morel M.C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21(6):895-902
- Céspedes M.E., Hernández L.I y Llópiz J. N. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cub. Invest Biomed.* 15(2):10-16.
- Chen C.S., Chao H.T., Pan R.L., y Wei Y.H. (1997). Maintenance of human sperm motility and prevention of oxidative damage through co-culture incubation. *Androl.* 29:227-233.
- Chen C.Y. y Mruk D.D (2002). Cell junction dynamics in the testis: sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol. Rev.* 82:825-874.

- Cisneros P.E., Pupo B.J. y Céspedes M.M.E. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. Rev Cub. Invest Biomed. 16:10-15.
- Cohen G., Dembiec D., y Marcus J. (1970) Measurement of Catalase Activity in Tissue Extracts. Anal. Biochem. 34:30-38.
- Crichton E.G., Krutzsch P.H. y Yanagimachi R. (1993) Stability of sperm plasma membrane of hibernating bats (*Myotis velifer*) compared with other mammals. J of Reprod and fertil. 97:1-4.
- Crichton E.G., Suzuki F., Krutzsch P.H. y Hammerstedt R.H. (1994) Unique features of the cauda epididymal epithelium of hibernating bats may promote sperm longevity. Anatom. Rec. 237:475-481.
- Cooper T. (1999). Encyclopedia of Reproduction Vol. 2, by Academic Press: 1-17.
- Finkel T., y Holbrook J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 408:239-245.
- García T.B., García M.O., Clapes H. S., Rodes F.L. y García P.J.C. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. Rev Cub Invest Biomed 14:10-14.
- Gill-Guzman E., Ollero M., López, M.C., Sharma R.K., Alvarez J.G., Thomas A.J., y Agarwall A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod. 16 (9):1922-1930.
- Godeas C., Tramer F., Micali F., Soranzo M., Sandri G., y Panfili E. (1997). Distribution and posible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. Biol. Reprod. 57:1502-1508.

- Halliwell B., y Gutteridge J.M.C. (1984) Oxigen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1-14.
- Hartree E.F. (1972). A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. *Anal. Biochem.* 48:422-427.
- Hernández P.O. y Rosado A. (1988). Biología molecular del espermatozoide humano. *Ciencia.* 39:249-260.
- Heuze D.I. Y. (1992), Efecto diferencial de la administración crónica de 17β estradiol sobre la fisiología y estructura de las distintas regiones anatómicas del epidídimo. Tesis de Maestría UAM Iztapalapa, México.
- Huang Y., Chung Y. y Wong P.Y.D. (1999), Potassium channel activity recorder from the apical membrane of freshly isolated epithelial cells in rat caudal epididymis. *Biol. Reprod.* 60:1509-1514
- Koji H., Hishikawa Y, Ando H., Nakanishi Y. y Kobayashi N. (2001). Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the Induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. *Biol. Reprod.* 64:946-954.
- Krishna A. y Singh K. (1997). The relationship between testicular activity, accessory sex glands, and circulating steroid concentration during the reproductive cycle in a male Indian vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Can J. Zool.* 75: 1042-1050.
- Krutzsch P. y Crichton E. (1987). Reproductive Biology of the Male Little Mastiff Bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae), in Southeast Australia. *The American J. of Anat.* 178: 352-368.
- Kurohmaru M, Saruwatari T., Kimura J., Mukohyama M., Watanabe G., Taya K., y Hayashi Y. (2002). Seasonal changes in spermatogenesis of the Japanese lesser horseshoe bat, *Rhinolophus cornutus* from a morohological viewpoint. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 79 (4):93-100.

- Legare C., Thabet M., Picard S., and Sullivan R. (2001). Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct: a reflection on the function of the human epididymis. *Biol. Reprod.* 64:720-727.
- León G.M.A., Fonseca T., López W.R., y Rosado A. (1999) Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Can. J. Zool.* 77:7-12.
- Lewis B. y Aitken J. (2001) Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biol Reprod* 64:1545-1556.
- López W.R. (1989), Fisiología de *Plecotus mexicanus* (*Chiroptera vespertilidae*) en el estado de Tlaxcala. Tesis Doctoral UNAM, México.
- Mruk D., Cheng Ch.H., Cheng y.H., Mo M.Y., Grima J., Silvestrini B., Lee W.M., y Cheng C.Y. (1998) Rat testicular extracellular superoxide dismutase: Its purification, cellular distribution, and regulation. *Biol. Reprod.* 59:298-308.
- Neil K.N., Lamirande E., y Gagnon C. (1992). Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil.Steril.* 58:809-816.
- Noguchi J., Toyama Y., Yuasa S., kikuchi K., y Kaneko H. (2002). Hereditary Defects in Both Germ Cells and the Blood-Testis Barrier System in as-Mutant Rats: Evidence from Spermatogonial Transplantation and Tracer-Permeability Analysis. *Biol. Reprod.* 67: 880-888
- Paglia D.E., y Valentine W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. I. *Lab. & Clin. Med.* 70:158-169.
- Pal Y. B. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Amer Physiol Society.* 74:139-162

- Plant T.M. y Marshall G.R. (2001). The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endoc Rev.* 22(6):764-786
- Quintero P. W., Mallea S. L., Machado C.A., Llópiz J. N., Céspedes M. E., Monzón B. G., y Yépes O. S. (2000). Efecto del estrés oxidativo sobre la calidad del semen de pacientes infértiles con leucocitospermia. *Rev Cub Invest Biomed.* 19:183-185.
- Rivlin J., Mendel J., Rubinstein S., Etkovitz N. y Breitbart H. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 70:518–522
- Robaire B. y Viger R. (1995) Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.* 52:226-236.
- Roveri A., Casaco A., Maiorino M., Dalan P., Calligaro A., y Ursini F. (1992) Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase of Rat Testis. *J. Biol. Chem.* 267: 6142-6146.
- Syed V. y Hecht N. (2001). Selective loss of sertoli cell and germ cell function leads to a disruption in sertoli cell-germ cell communication during aging in the brown Norway rat. *Biol. Reprod.* 64:107-112.
- Setchell B.P., Maddocks S. y Brooks D.E. (1994) Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. (Chapter 18); the *Physiology of Reproduction*. Second Edition, edited by Knobil and J.D. Neill, Raven Press, Ltd. New York.
- Sutovsky P., Moreno R., Ramalho-Santos J., Dominko T., Thompson W.E. y Schatten G. (2001). A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and limination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Scien* 114:1665-1675

- Taggart D.A. y Temple-Smith P.D. (1989) Structural features of epididymis in a dasyurid marsupial (*Antechinus stuartii*). Cell Tissue Res. 258:203-210.
- Tramer F., Rocco F., Micali F., Sandri G., y Panfili E. (1998) Antioxidant sistem in rat epididymal spermatozoa. Biol. Reprod. 59:753-758.
- Vernet P., Fulton N., Wallace C. y Aitken J. (2001). Analysis of Reactive Oxygen Species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa. Biol. Reprod. 65:1102-1113.
- Voglmayr J.K., Sawyer R.F. y Dacheux J.L. (1985). Glycoproteins: A Variable factor in surface transformation of ram spermatozoa during epididymal transit. Biol. Reprod. 33:65-176.