

Declaración de originalidad

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 10 de febrero del 2021.

Atentamente



Gihovani Ademir Samano Barbosa

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

“Marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios durante el almacenamiento prolongado en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*”

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en Biología de la
Reproducción Animal

P R E S E N T A

Biol. Gihovani Ademir Samano Barbosa

Comité tutorial

Codirectora: Dra. Edith Arenas Ríos

Codirector: Dr. Julio César Chávez Zamora

Asesor: Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Iztapalapa, Ciudad de México

10 de febrero, 2021

COMITÉ TUTORAL

Codirectora

Dra. Edith Arenas Ríos

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

Codirector

Dr. Julio César Chávez Zamora

Investigador Asociado "C" T.C.
Laboratorio del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide.
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología.
jcchavez@ibt.unam.mx

Asesor

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

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

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

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

Dr. Ricardo López Wilchis

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

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Departamento de Producción Agrícola y Animal.
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.
avalosr@correo.uam.mx

M. en C. Yoloxochitl Sánchez Guevara

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

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por el apoyo de la beca No. 928153. Programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), registro 003797.

A la UAM, por el Apoyo Extraordinario a los Alumnos de Posgrado registrados en el PNPC 2020.

MIEMBROS DEL JURADO

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “Marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios durante el almacenamiento prolongado en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*” con fecha: 10 de febrero de 2021.”



Presidente

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Departamento de Biología.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.



Secretario

Dr. Ricardo López Wilchis

Departamento de Biología.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

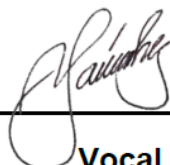


Vocal

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco



Vocal

M en C. Yoloxochitl Sánchez Guevara

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular.

Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00090

Matrícula: 2183801972

Marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios durante el almacenamiento prolongado en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 10 del mes de febrero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ
M. EN C. YOLOXOCHITL SANCHEZ GUEVARA
DR. RICARDO LOPEZ WILCHIS

Bajo la Presidencia del primero 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:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: GIHOVANI ADEMIR SAMANO BARBOSA

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

APROBAR

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

REVISO

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

VOCAL

DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

VOCAL

M. EN C. YOLOXOCHITL SANCHEZ GUEVARA

SECRETARIO

DR. RICARDO LOPEZ WILCHIS

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

DEDICATORIAS

A mi madre, Juana Rosa Barbosa, que, con su amor, trabajo y sacrificio en este tiempo, hemos logrado llegar hasta aquí. Ha sido un orgullo y privilegio ser tu hijo. Has sido un ejemplo a seguir, y no va haber manera de devolverte todo lo que me has ofrecido, este trabajo es un logro que, sin lugar a dudas, ha sido gracias a ti.

A mi abuelita, Sacramento Villegas, por estar conmigo en todo momento, porque con sus oraciones y palabras hicieron de mí, una mejor persona. Además de mi abuelita, una segunda madre.

A mi hermano, Ivan Samano, que ha estado siempre presente, desde que éramos unos niños, acompañándome, y con el apoyo moral que me brindo a lo largo de esta etapa.

A mi pareja, Jessica Morales, por apoyarme cuando más lo necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día. Tu ayuda ha sido fundamental, no fue sencillo culminar este proyecto, pero siempre fuiste motivadora y esperanzadora, me decías que yo podía hacerlo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Edith Arenas, quién con sus conocimientos y apoyo me ayudo a concluir satisfactoriamente el proyecto, brindándome todos los recursos y herramientas que fueron necesarios a pesar de las dificultades que se presentaban en el camino. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegue al laboratorio.

Al Dr. Ahiezer Rodríguez, por su orientación, tiempo y atención durante esta etapa, siendo fundamental en cada uno de los pasos. Gracias por los consejos para mejorar como alumno y como investigador.

Al Dr. Julio César Chávez, quien con sus conocimientos y observaciones enriqueció cada parte del proyecto. Gracias por la amabilidad y el tiempo brindado para mejorar la investigación.

Al Dr. Miguel Ángel León Galván, por brindarme atención y asesorarme en la elaboración de este trabajo. Gracias por guiarme por el mundo de los murciélagos, mostrándolos como uno de los grupos más fascinantes de la biología.

A mis amigos, Angie Campos, Ixchel Rojas y Edwin Mendoza, por su apoyo incondicional desde el primer día juntos, alentándome para seguir adelante. Agradezco su presencia en los momentos más difíciles, sus palabras y consejos hacían todo mucho mejor.

A mis compañeros de laboratorio y mis compañeros de clase de maestría, por que hicieron este proceso más divertido y emocionante. Gracias por compartir este tiempo de posgrado juntos, ya que cada uno de ustedes hacia cada clase, seminario o práctica más agradable.

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

ÍNDICE

1. Introducción	13
1.1 Participación del epidídimo en la fisiología espermática	13
1.1.1 Maduración espermática epididimaria	16
1.1.2 Almacenamiento espermático	17
1.2 Muerte celular programada y su relación con la eliminación de espermatozoides epididimarios.....	19
1.3 Los murciélagos y el almacenamiento de espermatozoides.	23
2. Antecedentes	28
2.1 El patrón reproductivo del murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i> y el almacenamiento prolongado de espermatozoides.....	28
2.2 Maduración espermática epididimaria en el murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i>	28
2.3 Marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios.....	30
3. Justificación	34
4. Pregunta de investigación o Planteamiento del Problema	35
5. Hipótesis	35
6. Objetivo general	35
6.1 Objetivos específicos	36
7. Material y Métodos	36
7.1 Área de muestreo.....	36
7.2 Captura de ejemplares	36
7.3 Obtención de los epidídimos y espermatozoides	37
7.4 Evaluación de la movilidad, viabilidad, y concentración espermática	37
7.5 Detección de caspasas 3 y 7 activas	38
7.6 Detección de externalización de fosfatidilserina.....	39
7.7 Daño al ADN de los espermatozoides.....	39
7.8 Detección del potencial transmembranal de la membrana interna mitocondrial.....	40
7.9 Análisis estadístico.....	40
8. Resultados y Discusión	41

8.1	Anatomía testicular y epididimaria	41
8.2	Movilidad, viabilidad, y concentración espermática.....	44
8.3	Caspasas 3 y 7 activas	48
8.4	Externalización de fosfatidilserina	54
8.5	Fragmentación de ADN.....	60
8.6	Pérdida de potencial de membrana mitocondrial	63
9.	Conclusiones	66
10.	Perspectivas	67
11.	Anexos	67
11.1	Soluciones.....	67
12.	Bibliografía	68

RESUMEN

En los mamíferos el espermatozoide no es capaz de fertilizar después de ser liberado de los testículos, adquiriendo su capacidad fertilizante en el epidídimo, durante un proceso denominado maduración espermática epididimaria. Existen ocasiones en las que no ocurre la eyaculación, y es entonces cuando el epidídimo se encarga de eliminar los espermatozoides. Una de las propuestas de los mecanismos involucrados en la eliminación es la participación de marcadores apoptóticos, pero pocos estudios han descrito el momento de aparición de éstos a lo largo del epidídimo. Aunado a esto, a uno de los marcadores apoptóticos (caspasas efectoras), se le ha propuesto una función distinta a la muerte celular, la maduración espermática. Una especie estacional como el murciélago *Corynorhinus mexicanus* que presenta asincronía entre sus funciones reproductivas y un periodo de almacenamiento prolongado, nos permite realizar un estudio para comprender el papel de los marcadores apoptóticos en los procesos de maduración y eliminación de espermatozoides. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue analizar la presencia de marcadores apoptóticos: caspasas 3 y 7, externalización de fosfatidilserina, fragmentación de ADN y pérdida de potencial de membrana mitocondrial, durante el periodo de almacenamiento epididimario prolongado en el murciélago *C. mexicanus*.

Se demostró la presencia de caspasas 3 y 7 en la etapa de maduración epididimaria, los niveles de índice de fluorescencia resultantes podrían indicar una participación en la maduración espermática. Posterior a esta etapa, indicarían el comienzo de la muerte celular. Se demostró la presencia de la externalización de fosfatidilserina durante la etapa de cópulas, esto podría indicar su participación futura en la fecundación. En la etapa de poscópula, funcionaría como señal de muerte celular. Se encontró daño al ADN principalmente en precópula y poscópula, pero no se puede confirmar que tenga una relación directa con la señalización apoptótica. La pérdida de potencial de membrana mitocondrial, parece no estar involucrada con la activación o presencia de los demás marcadores de muerte celular, por lo que no podría estar participando en la eliminación espermática.

ABSTRACT

In mammals, the sperm is unable to fertilize after being released from the testes, acquiring its fertilizing capacity in the epididymis, during a process called epididymal sperm maturation. There are times when ejaculation does not occur, and that is when the epididymis is responsible for eliminating sperm. One of the proposals for the mechanisms involved in the elimination is the participation of apoptotic markers, but few studies have described the moment of their appearance along the epididymis. In addition to this, one of the apoptotic markers (effector caspases) has been proposed a function other than cell death, sperm maturation. A seasonal species such as the *Corynorhinus mexicanus* bat that presents asynchrony between its reproductive functions and a prolonged storage period, allows us to carry out a study to understand the role of apoptotic markers in the processes of sperm maturation and elimination. Therefore, the objective of the present study was to analyze the presence of apoptotic markers: caspases 3 and 7, phosphatidylserine externalization, DNA fragmentation and loss of mitochondrial membrane potential, during the prolonged epididymal storage period in the bat *C. mexicanus*.

The presence of caspases 3 and 7 was demonstrated in the epididymal maturation stage, the resulting fluorescence index levels could indicate a participation in sperm maturation. After this stage, they would indicate the beginning of cell death. The presence of phosphatidylserine externalization was demonstrated during the copulation stage, this could indicate its future participation in fertilization. In the post-copula stage, it would function as a signal of cell death. DNA damage was found mainly pre-copula and post-copula, but it cannot be confirmed that it has a direct relationship with apoptotic signaling. The loss of mitochondrial membrane potential seems not to be involved with the activation or presence of the other markers of cell death, so it could not be participating in sperm elimination.

1. Introducción

El espermatozoide se desarrolla en los túbulos seminíferos al interior de los testículos, mediante un proceso conocido como espermatogénesis (Olivera *et al.*, 2006). Este proceso incluye la proliferación, reducción genómica y diferenciación celular; que variará dependiendo de la especie (Rodríguez-Tobón *et al.*, 2010). La célula germinal masculina adquiere su morfología definitiva en la fase final de la espermatogénesis, evento denominado espermiogénesis, en donde las espermatídes redondas, se diferencian a espermatozoides elongados (Olivera *et al.*, 2006). Una vez que los espermatozoides son liberados del epitelio seminífero, deberán viajar a través de los ductos eferentes hasta el epidídimo. Sin embargo, hasta este momento, los espermatozoides no son capaces de fertilizar al ovocito, por lo que necesitan completar los posteriores cambios estructurales, fisiológicos y bioquímicos durante su paso por el túbulo epididimario para adquirir esta capacidad (Robaire *et al.*, 2006).

1.1 Participación del epidídimo en la fisiología espermática

El epidídimo es un túbulo altamente enrollado que une los conductos eferentes provenientes del testículo, con el conducto deferente en su parte distal (Aitken *et al.*, 2007; Robaire *et al.*, 2006; Sullivan y Mieusset, 2016). Puede medir de 3 a 80 m dependiendo la especie (Eddy y O'Brien, 2006; Robaire *et al.*, 2006; Robaire y Viger, 1995). El conducto epididimario, al ser el sitio a donde se dirigen los espermatozoides, juega un papel importante en el aumento de la concentración espermática, así como en su protección, transporte, maduración y almacenamiento (Robaire *et al.*, 2006). Además, tiene la función de eliminar aquellas células que no son viables o no serán utilizadas (Ramos-Ibeas *et al.*, 2013).

Anatómicamente, el epidídimo se ha dividido en cuatro principales regiones: segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda* (Robaire *et al.*, 2006).

La regionalización de este órgano se debe a los diferentes tipos celulares que lo conforman (células principales, apicales, basales, halo, estrechas y claras) (Figura 1). En especies de laboratorio como la rata, se ha descrito que el tipo celular más abundante en el túbulo epididimario son las células principales, ubicadas a lo largo de todo el conducto, seguido por las células estrechas, que se encuentran en el segmento inicial, las células claras, basales y halo, las podemos encontrar en las tres regiones (Robaire *et al.*, 2006).

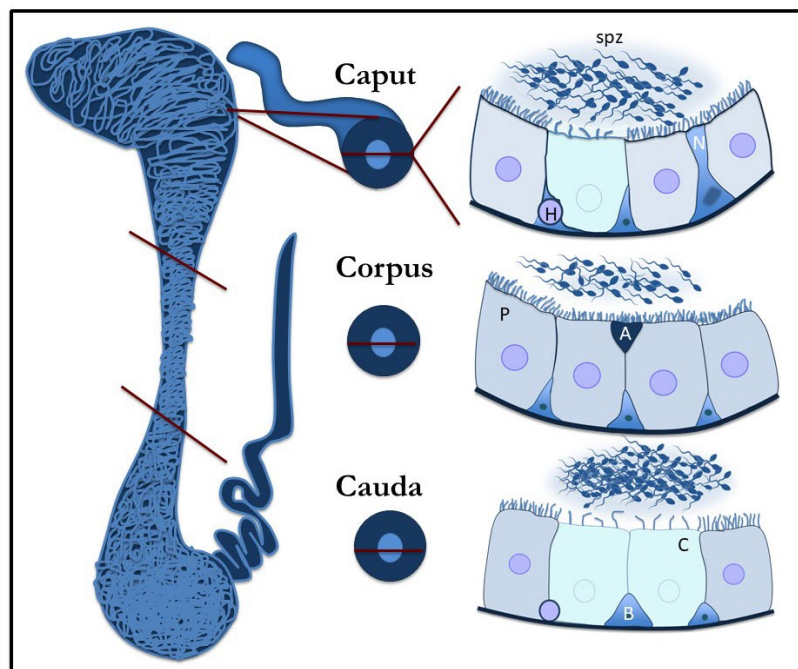


Figura 1. Esquema representativo de las tres principales regiones anatómicas del túbulo epididimario (*Caput*, *Corpus* y *Cauda*). Se muestra una sección transversal para cada región con los diferentes tipos celulares presentes. A) célula apical, B) célula basal, C) célula clara, H) célula de halo, N) célula estrecha y P) célula principal. Tomado de (Edith Arenas-Ríos *et al.*, 2017).

Las células principales poseen receptores para andrógenos, hormonas importantes en la síntesis de proteínas, que posteriormente participarán en la maduración espermática, así como en la formación de epididimosomas (pequeñas vesículas

formadas a partir de ampollas en la membrana plasmática de las células principales o estrechas) que tienen la función de acarrear proteínas y ácidos grasos a la membrana de los espermatozoides, participando en su maduración (Robaire *et al.*, 2006; Sullivan y Mieusset, 2016). Las células apicales, estrechas y claras; capturan sustancias del lumen mediante intercambiadores de sodio-hidrogeno, con la finalidad de acidificar el medio luminal, manteniendo un pH ácido que es importante para la maduración y para mantener al espermatozoide en un estado inmóvil durante su recorrido por el epidídimo junto, con proteínas específicas, ácidos e iones débiles, y con la prevención de la activación prematura de enzimas acrosomales (Herme *et al.*, 2000). Las células claras, además, tienen un papel endocítico, ya que estas células absorben la gota citoplasmática de los espermatozoides. Las células halo se han descrito como monocitos o linfocitos, por lo que son la barrera inmunológica del túbulo epididimario. Se ha sugerido, en el caso de las células basales, que pueden tener un papel en el procesamiento de antígenos, teniendo también un papel como células inmunes, así como participación en el transporte de agua e iones a las células principales (Robaire *et al.*, 2006).

El tiempo que tardan las células germinales en recorrer el túbulo epididimario de manera general en los mamíferos se encuentra entre un rango de 3 a 10 días (Amann y Howards, 1980; Robaire *et al.*, 2006). En el caso del humano, el tiempo promedio es de 11 días, aunque con un amplio intervalo que va de 1 a 21 días (Arenas-Ríos, 2009). Sumado a este tiempo, se encuentra el almacenamiento espermático en la región caudal (en promedio 15 días) (Cooper, 1998). El tiempo de almacenamiento espermático esta reportado en especies como: humano, mono Rhesus, cerdo, toro, rata y ratón; que se considera corto si se compara con modelos de fauna silvestre, como los murciélagos, en donde los espermatozoides pueden almacenarse en la región caudal del epidídimo durante varios meses sin perder su funcionalidad (Robaire *et al.*, 2006).

1.1.1 Maduración espermática epididimaria

Los procesos fisiológicos reproductivos en los vertebrados no son idénticos. En grupos como osteíctios, condrictios y anfibios, una vez que los espermatozoides son liberados de los testículos, estos tienen la capacidad para fertilizar al gameto femenino, pues ya poseen las moléculas necesarias para lograrlo (Robaire *et al.*, 2006). En cambio, en el grupo de los mamíferos, el espermatozoide es inmaduro, la capacidad fecundante aún no está activa, y se adquiere al recorrer el conducto epididimario, durante el proceso denominado maduración espermática epididimaria (Ford, 2004).

Se ha observado que la composición iónica, las moléculas orgánicas y las proteínas que tienen contacto con los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, son los que producen las continuas modificaciones que permiten el aumento en la carga negativa de la membrana plasmática, pérdida de la gota citoplasmática, cambio en el coeficiente fosfolípidos, colesterol, restructuración o remodelación de la forma del acrosoma, disminución del diámetro de las mitocondrias e incremento del movimiento progresivo (Awano *et al.*, 1993; Ecroyd *et al.*, 2004; Fàbrega *et al.*, 2011; Hernández y Rosado, 1988; Huang *et al.*, 1999; Légaré *et al.*, 2001; Lewis y Aitken, 2001; Naz y Rajesh, 2004; Sidhu *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2007; Tash & Bracho, 1994; Vernet *et al.*, 2001). Una vez ocurridos estos cambios los espermatozoides tendrán el potencial para capacitarse, llevar a cabo la reacción acrosomal y fecundar al ovocito (Ecroyd *et al.*, 2004; Fàbrega *et al.*, 2011; Lewis y Aitken, 2001; Naz y Rajesh, 2004; Sidhu *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2007).

De manera general, en la mayoría de los mamíferos se ha mencionado que, la maduración de los espermatozoides ocurre en las dos primeras regiones del epidídimo (*caput* y *corpus*). Sin embargo, en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* se ha comprobado que, este proceso continúa en la región caudal (Cervantes *et al.*, 2008; Rodríguez-Tobón, 2011; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2016), sirviendo no solo como sitio de almacenamiento, en comparación a los datos reportados para otras especies, en donde los espermatozoides que han recorrido las dos primeras regiones del epidídimo

únicamente serán almacenados en la cauda hasta el momento de la eyaculación (Cooper, 1998; Eddy y O'Brien, 2006; Robaire *et al.*, 2006; Setchell y Breed, 2006; Sullivan *et al.*, 2007).

1.1.2 Almacenamiento espermático

Una vez que los espermatozoides se encuentran en la región caudal, son almacenados y se mantienen en un estado de quiescencia, que significa que permanecen inmóviles y con un metabolismo bajo, en donde las mitocondrias se encuentran con bajo potencial de membrana con la finalidad de preservar reservas energéticas, disminuyendo la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS) que pondrían en riesgo a la célula (Hamamah & Gatti, 1998). En mamíferos, se almacenan en promedio por 15 días (Cooper, 1998). Se ha reportado que el humano, tiene una capacidad muy limitada de depósito de espermatozoides en contraste con algunas especies silvestres estacionales (Johnson y Varner, 1988; Sullivan y Mieusset, 2016).

La región caudal de epidídimo, a pesar de que varíe en su capacidad de almacenamiento, tiene un límite en depósito de espermatozoides (Sullivan y Mieusset, 2016). Cuando las células se encuentran almacenadas, el estado de quiescencia es inducido por diferentes mecanismos, donde está involucrado el fluido epididimario, que presenta concentraciones de sodio, cloro, calcio y magnesio que disminuyen desde el *caput* hasta la cauda, mientras que el fósforo, el zinc y el potasio aumentan (Aitken *et al.*, 2007; Dacheux y Dacheux, 2014; Foresta *et al.*, 2014). A su vez, la alta concentración de espermatozoides, reduce la concentración de O₂ y aumenta la de CO₂, aumenta la secreción de mucoproteínas viscosas por parte de las células epiteliales y por la producción de ácidos permeables que mantienen un pH bajo (<7) en el interior de los espermatozoides, como se mencionó anteriormente (Cooper, 1998).

Así mismo, la concentración de solutos orgánicos como el glutamato, la taurina, el ácido siálico, entre otros, aumentan a medida que los espermatozoides se acercan a la cauda, teniendo de 100 a 150 mM en el *caput* y más de 200 mM en la cauda. Aunque no es claro el papel y los mecanismos de acción que tienen estos solutos, se conoce que pueden servir de protección para el espermatozoide, ayudando al almacenamiento en la región caudal (Robaire *et al.*, 2006).

Una vez que los espermatozoides alcanzan la región caudal del epidídimo, ya han adquirido una serie de modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas para su posterior función al ser inseminados. Sin embargo, la eyaculación no siempre ocurre, pues no todos los individuos son exitosos para la cópula. Los machos competirán por hembras y solo los rasgos que incrementen el éxito reproductivo serán favorecidos (Krebs y Davies, 1993), así que, en aquellos machos que no copularon, los espermatozoides deberán ser eliminados por algún mecanismo. En algunas especies se ha reportado que la eliminación ocurre junto con la orina o por eyaculación espontánea, esta última, en ausencia de estimulación sexual puede ocurrir por eventos de ansiedad, pánico, estrés psicológico, complicaciones de drogas psiquiátricas y lesiones en la médula espinal (Otani, 2014; Redmond *et al.*, 1983; Yasien y Attia, 2010).

Dentro de los mecanismos propuestos para eliminar los espermatozoides se encuentra el de Sutovsky *et al.*, (2001), quienes propusieron que la ubiquitinación de los espermatozoides defectuosos en la superficie celular suministra la señal necesaria para que estas células sean fagocitadas por las células epididimarias principales, proporcionando así un mecanismo para el control de calidad de los gametos masculinos. Sin embargo, con base en extensas observaciones histológicas del epitelio epididimario normal y la rareza con la que se observa la fagocitosis de los espermatozoides, es evidente que la fagocitosis de estas células es un mecanismo poco probable para la eliminación de la gran cantidad de espermatozoides producidos diariamente (Cooper *et al.*, 2002).

Otra de las propuestas es la desarrollada por NagDas et al. (2000) y Olson et al. (2004), quienes han identificado una proteína similar al fibrinógeno (fgl2) que se secreta selectivamente en la cauda del epidídimo del hámster y que se une y recubre espermatozoides luminales no viables. A diferencia de la hipótesis del grupo de Sutovsky, NagDas et al. (2000) y Olson et al. (2004), proponen que el epidídimo posee un mecanismo específico para identificar y envolver los espermatozoides defectuosos con un complejo de proteínas que contiene fgl2 que permanece dentro de la luz del epidídimo. Ambos mecanismos nuevos requieren que las células epiteliales epididimales tengan la capacidad de reconocer y etiquetar espermatozoides defectuosos.

También se ha planteado la hipótesis de que después del retiro de andrógenos, ya sea por orquidectomía o como resultado de la variación estacional en especies estacionales, se activa una vía de señalización que conduce a la eliminación de los espermatozoides (Jones, 2004). Este mecanismo aseguraría que el epidídimo esté libre de espermatozoides defectuosos y/o muertos para su posterior preparación para el próximo período de reproducción.

Sin embargo, a pesar de estas propuestas, hacen falta más estudios que se enfoquen en los mecanismos involucrados en la eliminación de los espermatozoides epididimarios, puesto que es claro que el epidídimo tiene la función de eliminar aquellas células que no fueron utilizadas durante la eyaculación (Ramos-Ibeas *et al.*, 2013).

1.2 Muerte celular programada y su relación con la eliminación de espermatozoides epididimarios.

La muerte celular es un proceso crítico y activo que mantiene la homeostasis de un organismo, existiendo tres principales tipos de muerte: autofagia, necrosis y apoptosis (Green y Llambi, 2015). La autofagia, un proceso catabólico en el cual partes del citosol

y orgánulos específicos son englobados por una estructura de doble membrana, conocida como el autofagosoma, para ser degradados (Green y Llambi, 2015).

La necrosis, se caracteriza morfológicamente por ganar volumen celular (oncosis), hinchazón de organelos, ruptura de membrana plasmática y posterior pérdida de contenidos intracelulares. Aunque mucho tiempo se ha creído que este tipo de muerte es accidental, se han acumulado evidencias que indican que puede estar regulada por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos (Green y Llambi, 2015).

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se lleva a cabo de manera ordenada evitando procesos inflamatorios (Elmore, 2007), puede ser activada en respuesta a varios tipos de estrés celular, daño al DNA, privación de factores de crecimiento, estrés de retículo endoplásmico y señales del medio ambiente, radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia y EROS (Green y Llambi, 2015).

En células somáticas, este tipo de muerte ocasiona: la fragmentación nuclear, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), la exposición de residuos de fosfatidilserina (PS), la activación de caspasas 3 y 7 (proteasas específicas de cisteinil-aspartato), también conocidas como “caspasas efectoras”, la descomposición de la célula en fragmentos discretos (que se refiere comúnmente como “cuerpos apoptóticos”) y su posterior inmersión por fagocitos (Elmore, 2007; Galluzzi *et al.*, 2015; Green y Llambi, 2015; López-Trinidad *et al.*, 2016) (Figura 2).

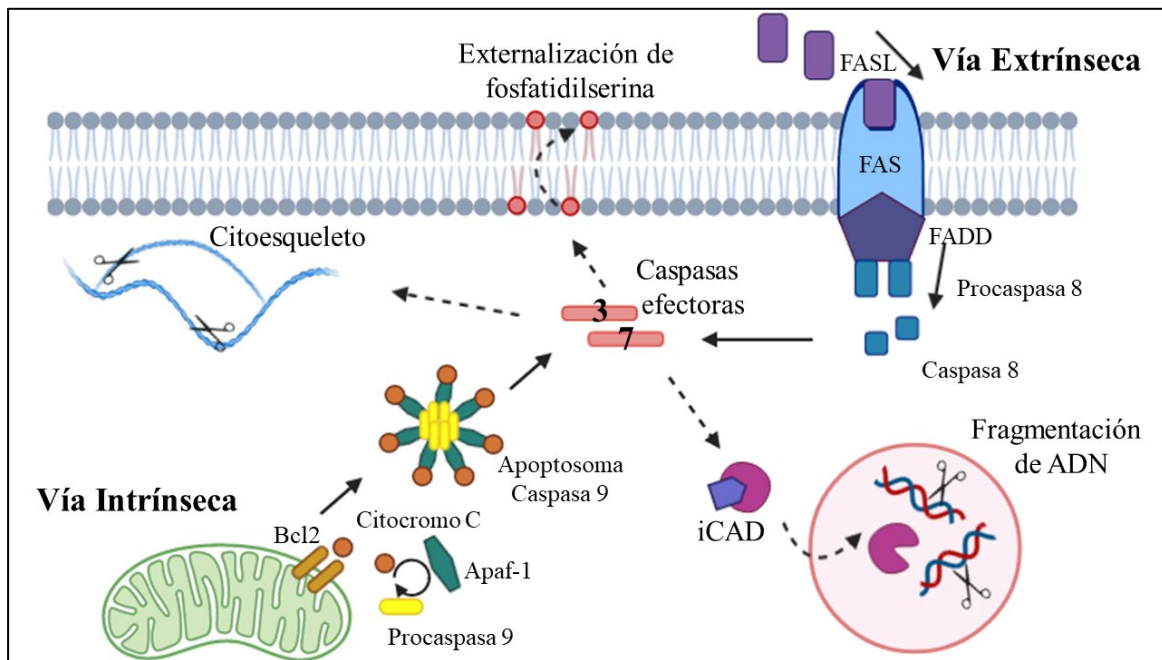


Figura 2. Vías de activación de las caspasas efectoras durante la apoptosis. Vía intrínseca y vía extrínseca (flechas negras). Principales sitios de acción de las caspasas (flechas punteadas).

La apoptosis puede desencadenarse tanto intrínsecamente (por ejemplo, por daño en el ADN) como extrínsecamente (por ejemplo, ligadura de receptores de muerte). Este evento culmina en la activación de caspasas efectoras, que son un grupo de cisteín-proteasas que se expresan como zimógenos inactivos en casi todas las células (Fuchs y Steller, 2015).

De manera más específica, la vía extrínseca se activa cuando un ligando específico se une a su correspondiente receptor de muerte en la superficie celular, como Factores de Necrosis Tumoral ($TNF-\alpha$ y $TNF-\beta$), Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionado con TNF (TRAIL) y Ligando Fas (Fas L), y sus receptores de muerte en la superficie celular: Receptor del TNF (TNFR), Receptor del Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionado con TNF (TRAILR), Receptor APO-1, también denominado Fas o CD9. Una vez ocurrida la unión del ligando de muerte a su receptor, se induce la trimerización de este último, seguida del reclutamiento al oligómero de la proteína adaptadora FADD (proteína con dominio de muerte que se asocia a Fas) y de la unión,

para su activación, de las procaspasas (8 y/o 10) iniciadoras de la apoptosis. Esta estructura supramolecular se denomina Complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC por sus siglas en inglés). En este complejo, las pro-caspasas (pre cisteín-proteasas) son convertidas mediante hidrólisis parcial, en caspasas activas, capaces de hidrolizar y con ello activar a las pro-caspasas efectoras o ejecutoras de muerte (caspasas 3 y 7) (Palacios *et al.*, 2011) (Figura 2).

Por el otro lado, la vía intrínseca o también llamada mitocondrial, es activada cuando hay una permeabilización de la membrana externa mitocondrial. El papel crítico de control de esta vía corresponde a las proteínas de la familia BCL-2, que incluye varios miembros pro-apoptóticos y otros anti-apoptóticos. Cuando las células perciben un estímulo extracelular (citotóxico, radiación UV, rayos X) o alguna señal intracelular (por ejemplo, daño del ADN, inestabilidad nuclear, etc), la membrana externa de la mitocondria sufre cambios en su potencial de membrana y en la transición de su permeabilidad. Como consecuencia, se liberan una serie de proteínas apoptóticas desde el espacio intermembrana al citosol: citocromo c, Factor-1 activador de las proteasas apoptogénicas (Apaf-1), endonucleasa G, factor iniciador de la apoptosis (AIF) y Smac/Diablo (segundo activador mitocondrial de caspasa). En el citosol, el citocromo c se une al factor activador de las proteasas apoptogénicas que, en presencia de ATP, atrae a la procaspasa iniciadora 9 para su activación en el complejo supramolecular denominado Apoptosoma. La caspasa 9 activa, hidroliza selectivamente a la procaspasa 3 para convertirla en caspasa 3 (Palacios *et al.*, 2011) (Figura 2).

Dentro del grupo de las caspasas, algunas tienen funciones cruciales en la apoptosis, pero también funciones no apoptóticas, como remodelación celular y diferenciación (Fuchs y Steller, 2015). Tradicionalmente, en mamíferos se dividen en dos categorías: caspasas iniciadoras, que incluyen caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12 y caspasas ejecutoras, que incluyen caspasas 3, 6, 7 y 14. La activación de caspasas ejecutoras, propaga una cascada proteolítica que conduce a la escisión de muchas proteínas celulares diana cruciales, incluida la escisión de un inhibidor de la ADNasa, que causa

la fragmentación nuclear del ADN, así como la escisión de proteínas encargadas de mantener la asimetría de la membrana plasmática, proceso apoptótico por el cual las células presentan la señal “cómeme” que instruyen la atracción de los fagocitos, la señal más conocida es la externalización de PS, aunque también incluyen lisofosfatidilcolina, esfingosina-1-fosfato y los nucleótidos ATP y UTP. Se ha demostrado que el proceso de externalización de PS es mediado, por la acción de flipasas y escramblasas, que en conjunto participan para mandar la señal, que previamente fue ejecutada por la caspasa 3 (Fuchs y Steller, 2015; Nagata *et al.*, 2020).

Aun cuando la muerte celular en gametos masculinos ha sido estudiada durante su desarrollo en los testículos y en los eyaculados, no se han realizado muchos estudios que describan el momento de aparición de marcadores apoptóticos cuando los espermatozoides transitan a lo largo del epidídimo (López-Trinidad, 2017).

En células somáticas, se han descrito los mecanismos de apoptosis. Sin embargo, en los espermatozoides no se pueden mostrar los mismos signos morfológicos debido a la particularidad de su estructura. Aunque actualmente se desconoce los mecanismos exactos de los cambios apoptóticos en los espermatozoides, se ha comprobado la presencia de algunos de los marcadores de las células somáticas típicos de la apoptosis en el gameto maduro (Talarczyk-Desole *et al.*, 2016)

Una de las pocas investigaciones donde se relaciona lo anterior, y en la que fueron determinadas varias señales apoptóticas, es la realizada por López-Trinidad (2017), cuyo objetivo fue analizar la relación de los marcadores apoptóticos, daño al ADN, caspasas 3 y 7 activas, externalización PS y pérdida del potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides epididimarios debido al envejecimiento.

1.3 Los murciélagos y el almacenamiento de espermatozoides.

Los murciélagos son el segundo orden más diverso de mamíferos a nivel mundial, con

1,116 especies. En México, están representadas nueve familias, con 138 especies (Medellín *et al.*, 2008; Simmons, 2005). Se encuentran distribuidos prácticamente en todo el mundo, por lo que se enfrentan a distintos ecosistemas, a los cuales se han adaptado modificando sus formas de vida. Se han descrito diversos patrones reproductivos que, de manera general se dividen en monoéstricos (que se reproducen una vez al año) y poliéstricos (que se reproducen dos o más veces al año). Los dos tipos de patrones pueden o no estar restringidos a alguna estación del año, considerándose estacional o no estacional (Racey y Entwistle, 2000).

A las especies de zonas templadas se les había considerado por mucho tiempo especies que hibernan, pero se ha determinado que no es así. Existen especies que presentan otra estrategia de descanso y ahorro de energía, como el torpor diario. Es decir, que a diferencia de la hibernación, es un sueño profundo que se interrumpe cada noche para ir a buscar alimento, como ocurre en *C. mexicanus* (López-Wilchis, 1989).

En los quirópteros que presentan algún tipo de letargo, sea hibernación o torpor, la periodicidad reproductiva de los machos está basada en el tiempo y la duración de los principales eventos de los ciclos reproductivos que muestren las hembras (Gustafson, 1979). Estos eventos reproductivos, y por tanto el periodo de letargo, resultan únicamente del clima y la disponibilidad de alimentos por lo que se han desarrollado estrategias para garantizar el éxito reproductivo, como el almacenamiento prolongado de espermatozoides (Pfeiffer y Mayer, 2013).

El proceso de almacenamiento prolongado de espermatozoides se define como una condición en la cual los espermatozoides permanecen viables con capacidad de fertilización por largos periodos de tiempo (Crichton y Kruttsch, 2000). A diferencia de otros mamíferos, en algunas especies de la familia Vespertilionidae y Rhinolophidae, los murciélagos hembra de las zonas templadas almacenan espermatozoides viables desde las cópulas en otoño durante algunos meses y, apoyándose de alguna estrategia de letargo, hasta que ocurre la ovulación y posterior fertilización. Sin embargo, no solo las hembras se ven involucradas, sino que los machos también son capaces de almacenar espermatozoides viables en la cauda epididimaria después de

haber concluido la espermatogénesis en los meses de verano. Esta peculiaridad podría no forzarlos a acoplar de forma precisa la espermatogénesis con el ciclo reproductivo femenino y también como una ventaja que les permite inseminar a las hembras durante todo el invierno, antes de la fertilización (Crichton, 2000; Crichton *et al.*, 1994; Crichton *et al.*, 1993; Pfeiffer y Mayer, 2013; Racey, 1979).

Diversos estudios han registrado casos de espermatozoides almacenado en el epidídimo durante varios periodos, permaneciendo viable desde 4 hasta 10 meses, dependiendo de la especie y las condiciones ambientales de sus hábitats (Cervantes *et al.*, 2008; Crichton *et al.*, 1994; Crichton *et al.*, 1993; Racey y Entwistle, 2000). Los quirópteros que presentan almacenamiento prolongado de espermatozoides son estacionalmente monoéstricos, iniciando el estro y las cópulas al final del otoño y típicamente entran en un estado de letargo al comienzo del invierno, observándose una sobreposición de ambos ciclos, en mayor o menor grado. Bajo la condición de letargo, los individuos reducen drásticamente sus funciones metabólicas y temperatura corporal; lo que conlleva a una disminución de sus actividades celulares y de varias funciones centrales relacionadas a los procesos reproductores como la producción de hormonas y la capacidad de los órganos blanco para responder a la estimulación hormonal (Wimsatt, 1960), al clima y a la disponibilidad de alimentos (Pfeiffer y Mayer, 2013).

En este interesante fenómeno hay dos parámetros importantes que deben tomarse en cuenta, el tiempo que permanecen almacenados los espermatozoides y que mantengan la viabilidad, y la capacidad de fertilización (Wimsatt, 1960). Se ha mencionado que, la regulación del mantenimiento estructural y funcional de los espermatozoides durante el prolongado periodo de almacenamiento, se debe, al ambiente epididimario (Crichton *et al.*, 1994; Crichton *et al.*, 1993).

De manera interesante, existen muchas especies tropicales no hibernantes que presentan almacenamiento prolongado en el epidídimo (Karim y Banerjee, 1985; Singh y Krishna, 1995). Además, algunas especies de murciélagos hibernantes se despiertan

regularmente durante la hibernación, por lo que la hipotermia no sería el único factor involucrado (Gopalakrishna y Bhatia, 1980).

En 1994 Crichton et al. reportaron, que las osmolalidades de los fluidos epididimales obtenidos *in vitro* de especies de murciélagos hibernantes (*Myotis lucifugus*) aumentan durante los períodos de almacenamiento de espermatozoides hasta 1,523 mmol/kg H₂O (aproximadamente 5 veces la del plasma), estableciendo que la hiperosmolalidad puede preservar la viabilidad y prevenir el inicio de la movilidad progresiva en los espermatozoides epididimarios de los murciélagos, así como inducir su inactividad al reducir la respiración. Al contrario, la reducción de la osmolalidad (a 500-600 mmol/kg H₂O) induce la hinchazón de los espermatozoides y permite el inicio de la movilidad y el aumento de la tasa metabólica. Dicho esto, condiciones hiperosmóticas impulsadas por células epididimarias deshidratan a los espermatozoides minimizando sus necesidades metabólicas, favoreciendo el almacenamiento.

Es importante mencionar que los murciélagos con almacenamiento prolongado de espermatozoides muestran asincronía temporal entre las funciones del testículo (producción de espermatozoides y andrógenos) y el epidídimo (maduración y almacenamiento de espermatozoides), porque este último órgano depende morfológica y funcionalmente de los andrógenos producidos en el testículo. Por lo tanto, el fenómeno de la regulación de la maduración espermática independiente de andrógenos en estos murciélagos es de gran interés (Arenas-Riós, 2017).

El murciélago *C. mexicanus*, especie endémica, habita en las zonas más altas y húmedas de los principales sistemas montañosos, a más de 2,000 metros sobre el nivel del mar. El patrón reproductivo de la especie es monoéstrico estacional, los machos presentan a su vez una asincronía temporal entre las funciones reproductivas primarias y secundarias, que se debe a una asincronía con la disponibilidad de la hembra, permitiendo que los espermatozoides se almacenen en el epidídimo por un largo periodo de tiempo (Figura 3). Esto se confirmó al examinar los espermatozoides obtenidos de las tres regiones principales del epidídimo durante todo su ciclo reproductivo, estando presentes de agosto a febrero, con una clara reducción en las

concentraciones en la región de *caput* a fines de octubre, mientras un aumento en la región de *cauda*. (Cervantes *et al.*, 2008; León-Galván *et al.*, 2005; López-Wilchis, 1989).

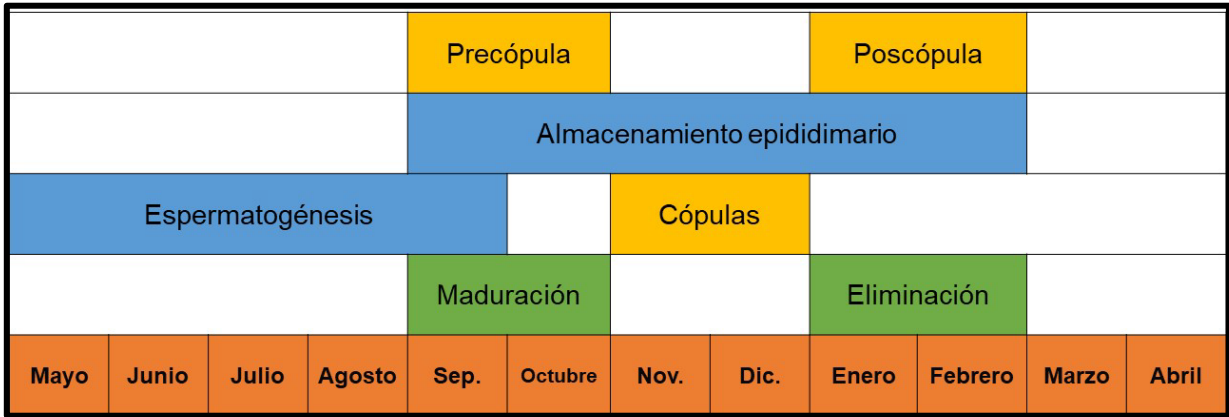


Figura 3. Patrón reproductivo estacional asincrónico de *C. mexicanus*. Se marcan las principales etapas dentro de ciclo reproductivo: precópula (inicio de la maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides), cópulas y poscópula (almacenamiento prolongado y/o eliminación de gametos).

C. mexicanus es una especie cuyas poblaciones están disminuyendo debido al deterioro de su hábitat y la interrupción constante de sus sitios de descanso. Es posible que la especie esté amenazada (López-Wilchis, 1989). La NOM-059 (2010), no la incluye en alguna de sus categorías de riesgo, y según la lista roja de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza por sus siglas en inglés), la categoriza como una especie casi amenazada, con una tendencia poblacional en decremento.

2. Antecedentes

2.1 El patrón reproductivo del murciélago *Corynorhinus mexicanus* y el almacenamiento prolongado de espermatozoides.

Una inusual particularidad reproductiva reportada en algunas especies de murciélagos como *C. mexicanus*, consiste en la asincronía temporal en el desarrollo y función de los órganos reproductores del macho, ya que el desarrollo de los testículos y la actividad de espermatogénesis ocurren en verano, mientras que el máximo desarrollo del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias, el cortejo y el apareamiento ocurre en otoño (Gustafson, 1979; Krishna y Singh, 1997; Krutzsch, 2009).

C. mexicanus presenta una espermatogénesis estacional no continua, que comienza en mayo y culmina en septiembre. Sin embargo, las hembras no están receptivas en ese momento, sino hasta los meses de noviembre y diciembre, por lo que los espermatozoides son almacenados hasta el momento en que la hembra sea receptiva. Sumado a esto, en algunos machos que no tuvieron éxito reproductivo, se ha encontrado evidencia de espermatozoides viables en la cauda epididimaria, hasta por 3 meses posterior a la cópula, por lo que se consideraría un periodo de almacenamiento espermático prologando de 5 o 6 meses (septiembre a febrero) (León-Galvan *et al.*, 1999; López-Wilchis, 1989) (Figura 3).

2.2 Maduración espermática epididimaria en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*

Durante varias décadas se ha reportado que es en las dos primeras regiones del epidídimo, donde se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides, siendo la región caudal donde se llevará a cabo el almacenamiento de espermatozoides (Amann y Howards, 1980; Cooper, 1998; Robaire *et al.*, 2006), que en el caso del vespertiliónido *C. mexicanus*, puede extenderse hasta por 5 meses después de que

los testículos han involucionado totalmente (Cervantes *et al.*, 2008; León-Galván *et al.*, 2005; López-Wilchis, 1989). La mayoría de los trabajos realizados en murciélagos hibernantes buscan determinar cómo es que se mantienen viables los espermatozoides por mucho tiempo. Sin embargo, algunos trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, mencionan que el largo periodo de almacenamiento de espermatozoides pudiera estar relacionado con el proceso de maduración (Cervantes *et al.*, 2008; Rodríguez-Tobón, 2011).

Cervantes *et al.* (2008), realizaron una investigación en la cual tomaron por separado espermatozoides de las tres regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) del murciélago *C. mexicanus* determinando la presencia de la gota citoplásmica, la posibilidad de inducir capacitación y reacción acrosomal *in vitro* (como medidas de maduración). Encontraron que el paso de los espermatozoides a través del epidídimo es rápido, y que, la región caudal no simplemente es un reservorio para los espermatozoides, sino que es también un sitio donde ocurre la maduración epididimaria, como sucede con la región de *caput* y *corpus* (Holland *et al.*, 1992).

Al igual que sucede en otras especies de mamíferos, en *C. mexicanus* la presencia de células principales y claras a lo largo del túbulo epididimario es una evidencia de que el proceso maduracional de los espermatozoides sucede desde el momento en que los espermatozoides ingresan al *caput* del túbulo epididimario a finales de agosto, y continúa durante el período de almacenamiento en la región caudal (Rodríguez-Tobón, 2011). Adicionalmente, se determinó que *C. mexicanus* presenta una relación directa entre la fosforilación de la tirosina y la progresión de la maduración espermática a través del epidídimo, durante el largo periodo de almacenamiento, confirmando que a diferencia de otros mamíferos el proceso maduracional culmina en la región caudal (septiembre y octubre) y puede estar asociado con el almacenamiento prolongado (Rodríguez-Tobón *et al.*, 2016). Es importante resaltar que la fosforilación de tirosinas de las proteínas de los espermatozoides es un factor importante en el proceso de maduración epididimaria, que implica la adquisición de la capacidad para moverse y la capacidad para fertilizar al ovocito (Lewis y Aitken, 2001; Naz y Rajesh, 2004).

En este quiróptero, los espermatozoides que se mantienen viables por varios meses, deberán ser eliminados por alguna vía. La apoptosis, proceso altamente organizado, pudiera estar removiendo las células disfuncionales, tal como sucede en el testículo, donde este mecanismo ya fue analizado en esta especie por León-Galván (2008), durante el periodo de espermatogénesis. No obstante, los espermatozoides no son capaces de morir por apoptosis, ya que, después de que abandonan el testículo, perdieron la capacidad para sintetizar proteínas, y a diferencia de lo que sucede con células somáticas, el gameto no se fragmenta en apoptosomas, por lo que el concepto de apoptosis no incluye al espermatozoide. Sin embargo, se sugiere utilizar presencia de señalizaciones o marcadores apoptóticos en espermatozoides del epidídimo, ya que se han reportado señales apoptóticas en estas células como actividad de caspasas 3 y 7, externalización de fosfatidilserina, fragmentación de ADN y pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Elmore, 2007; Galluzzi *et al.*, 2015; Kroemer *et al.*, 2009; Talarczyk-Desole *et al.*, 2016).

2.3 Marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios

Algunas de las manifestaciones y cambios apoptóticos que se han demostrado en los espermatozoides son el deterioro de la integridad de la membrana celular, fenómeno evidenciado por la externalización de PS, así como la presencia de la forma activa de la caspasa 3 que, a menudo se describen como células apoptóticas, término que puede ser engañoso, ya que si bien estos marcadores pueden participar en la eliminación espermática, la definición de apoptosis parece no cumplirse en su totalidad (Talarczyk-Desole *et al.*, 2016).

Si bien la actividad de las caspasas 3 y 7 es considerada como señal irreversible de muerte celular, existen reportes donde tienen participación en otras funciones celulares, como la diferenciación celular. Se ha reportado su participación en gametos masculinos de *Drosophila*, durante el proceso de espermiogénesis, etapa final de la individualización espermática, aquí, la activación de la caspasa dependiente del

citocromo c es necesaria para la eliminación del citoplasma celular (Arama *et al.*, 2003).

En células somáticas se ha reportado que la activación de caspasa 3 y caspasa 14 (caspasa específica del epitelio cornificado) durante la formación de queratinocitos pueden ser necesarias para la eliminación de los organelos en las etapas finales de diferenciación. Se ha reportado también en la diferenciación de linfocitos, células dendríticas y de monocitos/macrófagos. En conjunto, todos estos procesos fisiológicos, comparten la necesidad de un cambio bastante rápido y permanente en el fenotipo celular, como ocurre con su participación en la apoptosis (Nhan, 2006).

En estos ejemplos se puede considerar a las caspasas con la función de diferenciación terminal, y con esto, se les puede presentar como componentes de alguna vía de señalización involucrada en producir cambios rápidos, y posiblemente irreversibles, teniendo un efecto en la función fisiológica y/o la morfología celular. Por lo que, “Claramente, la presencia de caspasas activas no es evidencia suficiente, por sí misma, de muerte celular” (Nhan, 2006).

Recientemente se ha reportado que las células pueden aprovechar la actividad de la caspasa para procesos celulares no letales, siempre y cuando se esté evitando la muerte celular, lo que implica que deben existir mecanismos para reducir los niveles de actividad de caspasa en estas células. La pregunta que surge a partir de esto, es ¿cómo evitan algunas células, la muerte celular en presencia de caspasas activas que normalmente inducirían apoptosis en otras células? (Aram *et al.*, 2017).

Dentro de los mecanismos que mantienen los niveles de actividad de caspasa por debajo de un cierto umbral requerido para inducir la apoptosis, se sugiere que la actividad de caspasa parece estar restringida en el espacio y/o el tiempo. Las caspasas activas se han encontrado en dominios subcelulares específicos, como en los gránulos citoplasmáticos, durante la formación de pro-plaquetas en megacariocitos o en la diferenciación terminal de las espermatídes de *Drosophila*. La activación de las caspasas se coordina con la extrusión gradual de los contenidos

citoplasmáticos a granel, de modo que un complejo de ubiquitina ligasa (CRL3) activa gradualmente las caspasas en la misma dirección a lo largo de la célula. Además, la activación de caspasas por el complejo CRL3 se limita a la superficie de las dos mitocondrias de las espermátidas alargadas, lo que reduce aún más la tasa de activación de caspasas en todas estas células. Otro de los mecanismos posibles para mantener niveles bajos de caspasas activas, quizá esté relacionado con procesos cancerígenos, ya que una de las características de las células cancerosas es su capacidad para resistir la muerte celular, lo que implica que estas células normales y patológicas pueden compartir algunos mecanismos celulares (Aram *et al.*, 2017).

Con lo descrito anteriormente, es claro que las caspasas 3 y 7 activas desempeñan funciones no letales en diversos tipos celulares, como la diferenciación celular. Sin embargo, la diferencia en que tengan una participación no letal (no apoptótica) se sugiere que radica en los niveles de caspasas activas, siendo requeridos “niveles subletales” de caspasa efectora, para tener una oposición a la actividad completa que desencadenaría la vía de apoptosis (Aram *et al.*, 2017).

Si se comienza una señalización apoptótica, las caspasas participarán en la pérdida de la asimetría de la distribución de fosfolípidos de la membrana plasmática, exponiendo a PS, que corresponde a la marca conocida como “eat-me” (en inglés) para ser fagocitados. Se ha demostrado en espermatozoides que la externalización de PS en la región de cabeza y flagelo del espermatozoide, corresponden a células deterioradas y las que presentan la marca en la región acrosomal, son células viables (Gadella y Harrison, 2002).

También, durante el proceso de muerte celular programada, otra de las moléculas diana de la caspasa 3 es una ADNasa, ICAD (Inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasa, por sus siglas en inglés). Esta es causante de la fragmentación nuclear del ADN, por lo que también se podría considerar como un indicador de apoptosis, sin dejar de lado que este evento, puede ser desencadenado por diversos factores. En el espermatozoide la fragmentación del ADN se ha estudiado

ampliamente debido a su utilidad en técnicas de reproducción asistida y por la importancia de conocer los factores que lo ocasionan (Portella-Ruiz y Gonzales, 2016).

Una de las causas de la fragmentación de ADN es de origen testicular, debido a un empaquetamiento incompleto durante el proceso de espermiogénesis, también se ha propuesto que el principal origen de la fragmentación del ADN espermático se debe al estrés oxidante, evento molecular que ocurre cuando existe un desequilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno (provenientes principalmente de la mitocondria) y la defensa antioxidante (Portella-Ruiz y Gonzales, 2016). Este desequilibrio es causante de disfunciones mitocondriales, considerándose también como un marcador temprano de muerte celular programada en células somáticas, y que también se ha identificado en espermatozoides (Barroso *et al.*, 2006).

En el estudio de López-Trinidad (2017) se analizaron espermatozoides epididimarios de ratas de distintas edades (3, 12 y 18 meses), encontrando un porcentaje muy bajo de espermatozoides que presentaban externalización de PS, así como el daño al DNA, y pérdida del potencial de membrana mitocondrial. A diferencia de estos, el porcentaje de espermatozoides con presencia de caspasas activas fueron muy elevadas. De manera general se concluyó que los marcadores apoptóticos no aumentan con la edad. Sin embargo, cabe destacar que las caspasas pudieran participar en otra función diferente a la muerte celular, como la maduración espermática en el epidídimo.

Pocos estudios han reportado la manera en que son eliminados los espermatozoides del epidídimo. Se ha sugerido que puede ser por eyaculación espontánea, así como por medio de la orina, o, simplemente que sean reabsorbidos, pero hasta el momento se desconoce con certeza los mecanismos y, sobre todo, de qué manera mueren los espermatozoides en el epidídimo. Lo anterior obedece a que, estos estudios se han realizado en especies no estacionales. Por lo tanto, los espermatozoides almacenados en la región caudal, son la suma de los espermatozoides que se acaban de producir y aquellos que están a punto de morir, mismos que serán difícil de diferenciar. Por otro lado, cabe destacar que proteínas como las caspasas pudieran contribuir en el proceso de maduración epididimaria (López-Trinidad, 2017). Lo anterior permite considerar al

murciélago *C. mexicanus* como un modelo excelente para determinar la participación de algunos actores de la apoptosis en el proceso de maduración, almacenamiento y eliminación de espermatozoides, debido a la naturaleza reproductiva de la especie.

3. Justificación

Los trabajos reportados sobre la eliminación de espermatozoides epididimarios cuando no se presenta la eyaculación, no dejan en claro los mecanismos involucrados en su eliminación, debido a que los estudios realizados usan como modelos a especies no estacionales, como la rata (Cooper *et al.*, 2002; Jones, 2004; López-Trinidad, 2017; NagDas *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2004; Ramos-Ibeas *et al.*, 2013; Sutovsky *et al.*, 2001). No obstante, en una especie estacional como el murciélago *C. mexicanus* que presenta, no solo asincronía entre sus funciones reproductivas, sino también, un periodo prolongado de almacenamiento de espermatozoides en la cauda epididimaria, en donde se ha reportado que los gametos se encuentran viables por varios meses después del periodo de cópula, nos permitirá realizar un estudio que ayude a comprender el papel de los actores apoptóticos en los procesos de maduración y eliminación de espermatozoides, entre los que se encuentran: caspasas 3 y 7 activas, externalización de fosfatidilserina, fragmentación de ADN y pérdida de potencial de membrana mitocondrial.

La determinación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial podrá proponer una posible vía de activación de caspasas (vía intrínseca) para la eliminación de la célula. A su vez, esta investigación, nos ayudará a responder si las caspasas 3 y 7 tienen alguna participación en el proceso de maduración espermática epididimaria.

Por otro lado, aportará información valiosa sobre la viabilidad de los gametos durante el largo periodo de almacenamiento, que en esta especie puede llegar a ser de hasta 5 meses en la región caudal del epidídimo. Esta información ayudará a considerar metodologías para el mejoramiento de la calidad espermática *in vitro* en muestras que sean sometidas a refrigeración, criopreservación-descongelación. También permitirá plantear estrategias de obtención de espermatozoides epididimarios pos-mortem,

como en el caso de especies de gran valor ecológico, refiriéndonos a especies incluidas en alguna categoría de riesgo dentro de las normas mexicanas o internacionales.

4. Pregunta de investigación o Planteamiento del Problema

¿Las caspasas 3 y 7 activas están involucradas en el proceso de maduración espermática en la etapa pre-copulatoria en *C. mexicanus*?

¿Las caspasas 3 y 7 activas, externalización de fosfatidilserina, fragmentación de ADN y pérdida de potencial de membrana mitocondrial son marcadores involucrados en la eliminación de espermatozoides en *C. mexicanus*?

5. Hipótesis

- 1) Si los espermatozoides epididimarios del murciélago *C. mexicanus* presentan actividad de caspasas 3 y 7 durante la fase pre-copulatoria, entonces, podría sugerir que participan en la maduración epididimaria.
- 2) Si durante la fase poscópula los gametos presentan: caspasas 3 y 7 activas, externalización de fosfatidilserina, fragmentación de ADN y pérdida de potencial de membrana mitocondrial, nos dará un indicio de que participan en el proceso de eliminación espermática epididimaria.

6. Objetivo general

Determinar si los actores apoptóticos en espermatozoides epididimarios del murciélago *Corynorhinus mexicanus* participan en el proceso de maduración y eliminación de espermatozoides.

6.1 Objetivos específicos

- Para determinar la participación de las caspasas 3 y 7 activas en el proceso de maduración espermática epididimaria en el murciélago *C. mexicanus*, se realizará el análisis de caspasas 3 y 7 activas en espermatozoides epididimarios en la etapa de precópula.
- Para determinar si las caspasas 3 y 7 activas, externalización de fosfatidilserina, fragmentación de ADN y pérdida de potencial de membrana mitocondrial participan en la eliminación de espermatozoides en el epidídimo del murciélago *C. mexicanus*, se realizará su análisis en la etapa de poscópula del almacenamiento epididimario.

7. Material y Métodos

7.1 Área de muestreo

El estudio se realizó en el refugio “El Túnel” ubicado a 10 km E de Tlaxco, Tlaxcala (1983701400 N, 9880200200 W; 3220 m de altitud), se realizaron un total de 4 muestreos que abarcaron el periodo de almacenamiento epididimario prolongado (octubre-febrero) (León-Galván *et al.*, 2005; López-Wilchis, 1989; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2016).

7.2 Captura de ejemplares

Los ejemplares se capturaron con redes de golpe y a mano con guantes de carnaza durante el día (entre las 13:00 y 16:00 h) mientras los organismos se encontraban en el interior del refugio. Se contó con el permiso de colecta SGPA/DGVS/07397/19 otorgado al Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón por la Dirección General de Vida Silvestre dependencia de la SEMARNAT.

Se capturaron un total de 12 murciélagos machos adultos, 3 ejemplares por etapa reproductiva: PRE: precópula (octubre), COP: cópula (diciembre), POS1: poscópula 1 (enero) y POS2: poscópula 2 (febrero). Los criterios de selección de los individuos sexualmente maduros incluyeron el cierre completo de las epífisis metacarpo-falangeal del cuarto dedo de la mano (Kunz y Anthony, 1982) y evidencia de espermatozoides en la región caudal del epidídimo, el cual se observa escrotal, con apariencia bulbosa y de tono blanquecino (León-Galván *et al.*, 2005; López-Wilchis, 1989; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2016).

El manejo de los animales a partir de la captura se realizó de acuerdo a las normas científicas establecidas en Sikes y Gannon (2011) y el proceso del material biológico y químico en laboratorio se realizó de acuerdo a los lineamientos de la comisión de ética de CBS de la UAM-I (Anónimo, 2010).

7.3 Obtención de los epidídimos y espermatozoides

Los ejemplares que fueron transportados vivos al laboratorio, fueron sacrificados por decapitación (León-Galván *et al.*, 2005). Se les realizó una incisión en la región pélvico-ventral e inmediatamente después, los epidídimos fueron extraídos, medidos con un vernier y pesados en una balanza analítica. Posteriormente fueron seccionados en sus tres principales regiones anatómicas (*caput*, *corpus* y *cauda*) de acuerdo al procedimiento descrito por Cervantes *et al.* (2008). Una vez obtenido el epidídimo, se colocó cada región en distintos tubos Eppendorf con 1 mL de solución Ringer para posteriormente ser picado. Se dejó que los espermatozoides se liberaran del tejido epididimario por 5 minutos, y se centrifugó (500g x 5 minutos). Se retiró el sobrenadante y se aforó a 1 mL con solución Ringer.

7.4 Evaluación de la movilidad, viabilidad, y concentración espermática

Para la evaluación de los parámetros espermáticos se utilizaron los métodos estandarizados, de acuerdo al manual de laboratorio para la examinación y

procesamiento de semen humano (WHO, 2010) adaptándolos al tipo de muestra de este estudio. Se registró la movilidad, la viabilidad y la concentración espermática.

La movilidad se determinó tomando 10 μL de muestra de cada región y haciendo un conteo de 100 células en el microscopio de campo claro a un aumento de 40X, categorizándose como móviles o no móviles. Para medir la viabilidad espermática se utilizó la solución de eosina-nigrosina (E-N), que se preparó disolviendo 0.67 g de eosina y 10 g de nigrosina en 100 ml de una solución de cloruro de sodio al 9%. A continuación, se realizó un frotis usando 10 μL de muestra y 10 μL del E-N. En el microscopio de campo claro a un aumento de 40X, se realizó un conteo de 100 células diferenciando entre espermatozoides muertos (color rosado) y espermatozoides vivos (sin coloración). En la concentración espermática se utilizó una dilución 1:50, y se realizó el conteo en una cámara Neubauer en un microscopio de campo claro a un aumento de 40X.

7.5 Detección de caspasas 3 y 7 activas

La actividad de la caspasa 3 y 7 activas fue marcada con FLICA (Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases, por sus siglas en inglés) un inhibidor de caspasas unido a un fluorocromo (carboxifluoresceína), y se manejó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. FLICA es permeable, pasa a través de una membrana plasmática y se une a la caspasa activa. Cualquier FLICA no unida se difunde fuera de la célula y se lava; se une solamente a la caspasa activa, no hay interferencia de pro-caspasas o formas inactivas de la enzima. El reactivo asocia una fracción de fluorometilcetona (FMK), que reacciona covalentemente con una cisteína, una secuencia de aminoácidos específica de caspasa. Un grupo carboxifluoresceína (FAM) se adjunta como un reportero (Vybrant® FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (V35118) – Molecular Probes).

Para demostrar la especificidad de FLICA se realizó un control usando dexametasona a una concentración final de 1 μM durante 20 min. Después la alícuota fue procesada

para detectar caspasas activas (Hernández *et al.*, 2006). Se evaluaron la presencia de caspasas activas contando 100 células en el microscopio de epifluorescencia, para buscar patrones de marcaje. Se utilizaron 10 mil células para identificar su presencia mediante el citómetro de flujo (López-Trinidad, 2017).

7.6 Detección de externalización de fosfatidilserina

Para la detección de PS se utilizó el Annexin V-FITV Kit (MACS Miltenyi Biotec), donde 5×10^6 espermatozoides/mL fueron incubados por 5 min a 37 °C con Anexina V-FL (1 µg/ml) y se procedió de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} con alta afinidad por la fosfatidilserina. La Anexina V-FL es una proteína no permeable a la célula, por lo que se une a la fosfatidilserina que se ha redistribuido y se encuentra en la capa externa, evento que ocurre en eventos de muerte celular. Las células se clasificaron según los patrones con el marcaje de Anexina V (cabeza, pieza media o ambas), y se realizó un conteo de 100 células usando el microscopio epifluorescencia (De Vries *et al.*, 2003; Gadella y Harrison, 2002). Una alícuota de 10×10^4 espermatozoides fue analizada por citometría de flujo, para detectar la fluorescencia de Anexina V, que corresponde a espermatozoides con externalización de fosfatidilserina y analizó contando 100 células en el microscopio de epifluorescencia para buscar patrones de marcaje (De Vries *et al.*, 2003; López-Trinidad, 2017). Se realizó un control positivo con espermatozoides capacitados, dado, que en este proceso, se lleva a cabo la externalización del fosfolípido (Darszon *et al.*, 2011). Se sometieron a capacitación por 6 horas en incubación a 37°C y 5% de CO₂.

7.7 Daño al ADN de los espermatozoides

Una alícuota de 5×10^6 espermatozoides/mL fueron teñidos con Naranja de Acridina (NA) (Apedaile *et al.*, 2004; Gadella y Harrison, 2002), analizando 10 mil eventos por citometría de flujo. LA NA es un fluorocromo metacromático y el test se basa en someter a la célula primeramente a un agente desnaturante [Tritón X100 0.1% v/v

en HLC (0.08 M) y NaCl (0.15 M)] y posteriormente realizar una tinción con NA [NA (6 µg/ml) en NaCl (0.15 M), EDTA (1 mM), Na₂HPO₄ (0.2 M) y ácido cítrico (0.1 M) (pH 6)]. El espectro de emisión del fluorocromo (verde o naranja) depende del estado de la hebra de ADN. En caso de que el colorante se intercale con la doble hélice intacta del ADN, emite una fluorescencia verde. Por el contrario, cuando el ADN se encuentra desnaturalizado, la unión del fluorocromo con la hebra simple genera una fluorescencia naranja (Alvarez *et al.*, 2015; López *et al.*, 2010). Se utilizó H₂O₂ (100mM) por una hora a 37 °C como control positivo, induciendo daño al material genético para detectar ruptura de cadenas de DNA (López-Trinidad, 2017).

7.8 Detección del potencial transmembranal de la membrana interna mitocondrial
Una muestra de 5 x 10⁶ espermatozoides/mL fue teñida por 18 min a 37°C con Mitotracker Green (2.5nM), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por citometría de flujo evaluando diez mil eventos (Gadella y Harrison, 2002). Las sondas Mitotracker Green se difunden pasivamente a través de la membrana plasmática, una vez que penetran en las células contienen un resto de clorometilo ligeramente reactivo con el tiol para marcar las mitocondrias activas, acumulándose en ellas (MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes, invitrogen – Molecular Probes). Como control positivo se midió la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducida con cianuro, incubándose durante 40 min bajo las mismas condiciones indicadas en el reactivo.

7.9 Análisis estadístico

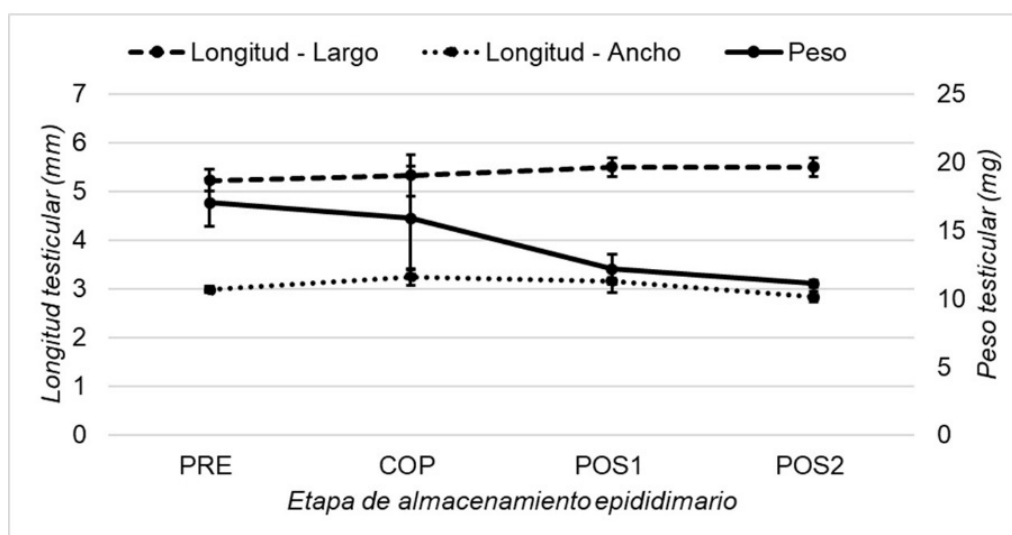
Los datos obtenidos para las diferentes variables (caspasas 3 y 7 activas, externalización de fosfatidilserina, fragmentación de ADN y pérdida de potencial de membrana mitocondrial) se agruparon para hacer comparaciones entre los porcentajes obtenidos en cada una de las etapas de los periodos de maduración y almacenamiento espermático epididimario (PRE, COP, POS1 y POS2). Se comprobó la homocedasticidad de las varianzas con una prueba de Levene modificada. En el

caso que la variabilidad de los datos se mantuvo constante, se aplicaron pruebas paramétricas, utilizando un análisis de varianzas (ANDEVA) seguido de Tukey's-Kramer post-hoc, considerando $p < 0.05$ como diferencias significativas, y en caso de que no se mantuvieran constantes se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis seguida de Mann-Whitney post-hoc, $p < 0.05$ como valor de significancia.

8. Resultados y Discusión

8.1 Anatomía testicular y epididimaria

Los testículos de *Corynorhinus mexicanus* que fueron analizados para este estudio se mantuvieron sin cambios en longitud (mm) y peso (g) durante las cuatro etapas analizadas (PRE, COP, POS1 y POS2), ($p < 0.05$) (Gráfica 1). Esto se aprecia desde una vista macroscópica, donde el órgano es apenas visible (Figura 4). La ausencia de cambios en el testículo se debe a la etapa en la que se encuentra la especie (etapa de almacenamiento epididimario). Para el mes de septiembre la espermatogénesis ha concluido, y a partir del mes de octubre hasta el mes de enero se ha reportado que no hay actividad testicular, encontrándose únicamente túbulos constreñidos y espermátidas degeneradas (López-Wilchis, 1989).



Gráfica 1. Variación mensual del tamaño (mm) y peso (mg) testicular de *C. mexicanus* durante el almacenamiento prolongado. PRE: precópula (octubre); COP: cópula (diciembre); POS1:

poscópula 1 (enero); PS2: poscópula 2 (febrero). Los puntos representan el promedio \pm EE. ANOVA seguido de Tukey-Kramer post-hoc. $n=3$.

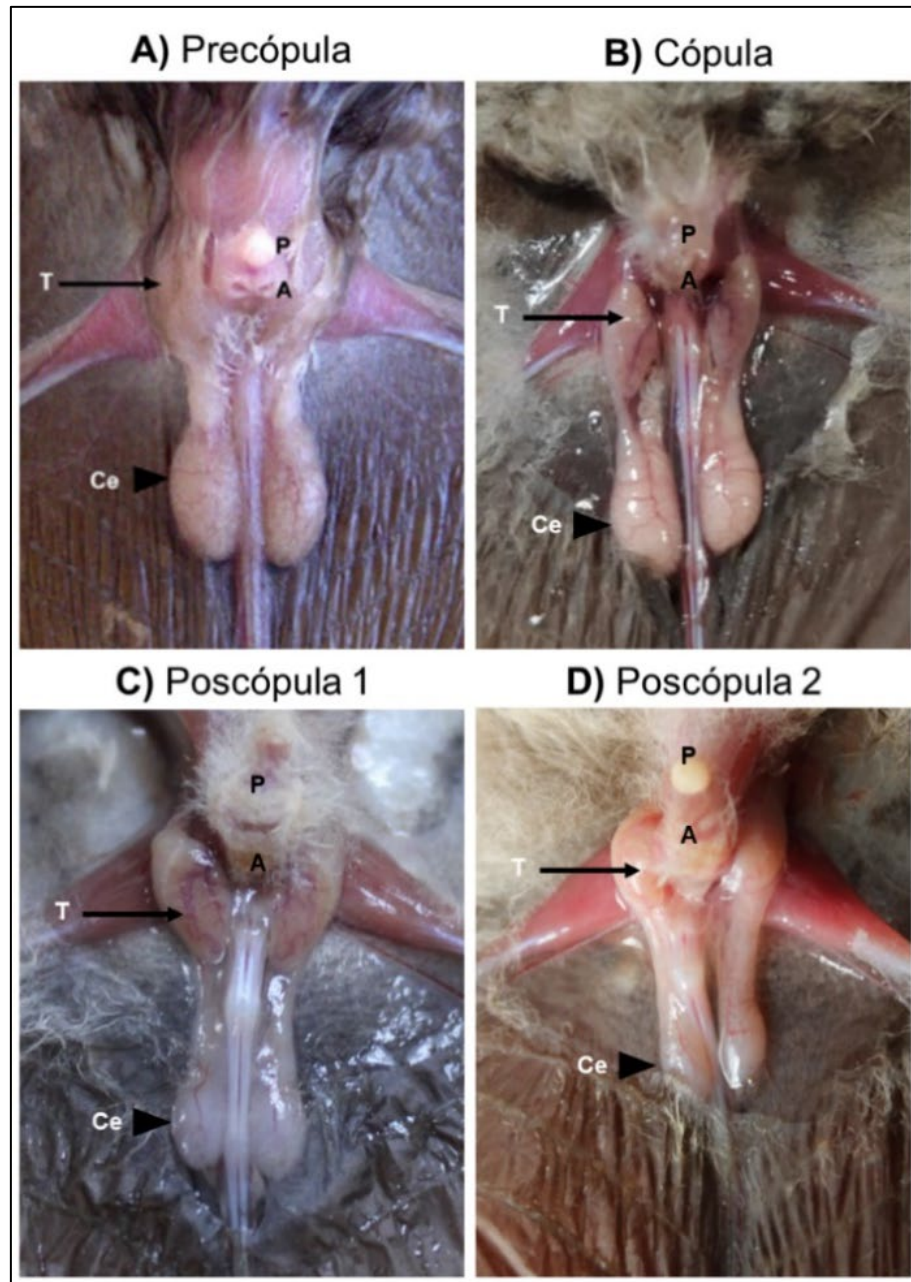
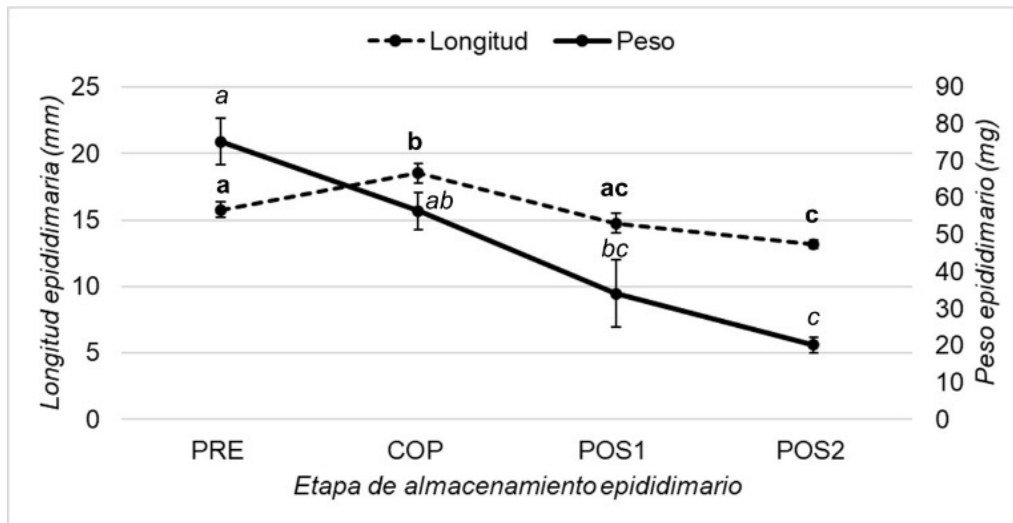


Figura 4. Principales cambios morfológicos del epidídimo de *Corynorhinus mexicanus* durante el almacenamiento prolongado. A) precópula (septiembre); B) cópula (diciembre); C)

Poscópula 1 (enero) y; D) Poscópula 2 (febrero). Imagen A) tomada de León-Galván et al. (2005). A: Apertura anal; T: testículo; P: pene; Ce: cola epididimaria.

El epidídimo, a diferencia del testículo, si presenta cambios a lo largo de las fechas analizadas, esto es resultado de la etapa en la que se encuentra, el almacenamiento epididimario (López-Wilchis, 1989). El tamaño más grande observado de este órgano se presenta en COP (18.5 ± 0.76 mm) y el menor tamaño en POS2 (13.16 ± 0.30 mm) (Gráfica 2). El peso epididimario mayor observado se presentó en PRE (0.07 ± 0.006 g) y el menor en POS2 (0.02 ± 0.002 g) (Gráfica 2). León-Galván et al. (2005), reportaron previamente valores similares durante el periodo de almacenamiento, correspondiendo los mayores valores en etapa de precópula y los menores una vez ocurridas las cópulas. A nivel macroscópico, el cambio no es muy visible en las primeras etapas del almacenamiento (PRE y COP). Sin embargo, hacia la etapa final (POS2), se comienza a observar cambios en la coloración del órgano, donde la apariencia bulbosa se mantiene, pero el color blanquecino ya no es tan evidente, presentándose ligeramente hialino (POS1), en la etapa final, la apariencia bulbosa ha desaparecido, así como el color blanquecino (Figura 4). Anteriormente Rodríguez-Tobón et al. (2010), reportaron de manera esquematizada los cambios del tracto reproductor masculino durante un ciclo anual, en donde se pueden comparar los cambios en el epidídimo a nivel macroscópico, que tienden a disminuir conforme avanza el tiempo de almacenamiento, tal como se observa en la figura 4.



Gráfica 2. Variación mensual del tamaño (mm) y peso (mg) epididimario de *Corynorhinus mexicanus* durante el almacenamiento prolongado. PRE: precópula (octubre); COP: cópula (diciembre); POS1: poscópula 1 (enero); PS2: poscópula 2 (febrero). Los puntos representan el promedio \pm EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se comparan las etapas de estudio. ANOVA seguido de Tukey-Kramer post-hoc. $n = 3$.

8.2 Movilidad, viabilidad, y concentración espermática

Se realizó la evaluación de los parámetros espermáticos con la intención de conocer el estado fisiológico de las células obtenidas del epidídimo durante las diferentes etapas del almacenamiento prolongado. Los datos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Determinaciones espermáticas (movilidad [%], viabilidad [%] y concentración espermática [millones/mL]) de *caput*, *corpus* y *cauda* en etapas de almacenamiento prolongado de *Corynorhinus mexicanus*. PRE: precópula (octubre); COP: cópula (diciembre); POS1: poscópula 1 (enero); POS2: poscópula 2 (febrero); -: sin espermatozoides. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compara entre etapas de almacenamiento de una misma región epididimaria y el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la región anatómica anterior. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post-hoc. $n = 3$ murciélagos por etapa.

Movilidad espermática (%)			
	Región epididimaria		
	<i>Caput</i>	<i>Corpus</i>	Cauda
PRE	23.33 ± 6	66.66 ± 4.97*	92.33 ± 2 ^{a*}
COP	22 ± 5	74 ± 3.60*	90.66 ± 1.76 ^{a*}
POS1	-	52 ± 5.92	83.33 ± 4.91 ^{ab*}
POS2	-	-	53 ± 13.89 ^b
Viabilidad espermática (%)			
	Región epididimaria		
	<i>Caput</i>	<i>Corpus</i>	Cauda
PRE	82.6 ± 1.66	85.66 ± 3.92	95.33 ± 1.76 ^a
COP	78.3 ± 1.45	83.33 ± 3.28	92 ± 4.16 ^a
POS1	-	66.66 ± 6.93	86.33 ± 3.17 ^a
POS2	-	-	80.33 ± 3.17 ^b
Concentración espermática (millones/mL)			
	Región epididimaria		
	<i>Caput</i>	<i>Corpus</i>	Cauda
PRE	9.33 ± 1.33 ^a	24.66 ± 2.60 ^{a*}	192 ± 2.30 ^{a*}
COP	4.66 ± 2.6 ^b	18.33 ± 2.60 ^{a*}	201 ± 5.85 ^{a*}
POS1	-	3.33 ± 1.33 ^b	57 ± 9.64 ^{b*}
POS2	-	-	16.33 ± 4.25 ^c

El porcentaje de espermatozoides móviles fue distinto conforme a la etapa del almacenamiento prolongado (PRE, COP, POS1, POS2), así como también en las regiones anatómicas epididimarias (*caput*, *corpus* y *cauda*). En la etapa PRE, se encontró el mayor porcentaje de espermatozoides móviles en la cauda (92.33±2%), siendo diferente significativamente ($p < 0.05$) del *caput* (23.33±6%). En COP se mostró el mismo comportamiento, mayor en cauda (90.66±1.76%) y menor en *caput* (22±5%). Para POS1, el *corpus* presentó un valor promedio de 52±5.92% y en la cauda un valor promedio de 83.33±4.91%, lo cual es estadísticamente significativo ($p < 0.05$). En la etapa final, POS2, la cauda mostró un valor promedio de 53±13.89%.

Las observaciones a lo largo del periodo de almacenamiento en cada una de las regiones anatómicas mostraron una disminución de la movilidad. En *caput* disminuyó

de 23.33 ± 6 (PRE) a $22 \pm 5\%$ (COP), pero no mostró diferencia estadística. En el caso de *corpus* y *cauda*, la movilidad fue de $66.66 \pm 4.97\%$ (PRE) a $52 \pm 5.92\%$ (POS1) y $92.33 \pm 2\%$ (PRE) a $53 \pm 13.89\%$ (POS2), respectivamente. Si embargo, solo la *cauda* muestra diferencia significativa ($p < 0.05$). Los cambios en la movilidad espermática son considerados una modificación que ocurre durante la maduración espermática epididimaria, tendiendo a un incremento en el movimiento progresivo de *caput* a *cauda* (Robaire *et al.*, 2006). En los resultados obtenidos, si ocurre un aumento en la movilidad de *caput* hacia la *cauda* en las etapas analizadas. No ocurre lo mismo cuando se observa la movilidad espermática de una misma región epididimaria a lo largo de las etapas de almacenamiento, en este caso la movilidad disminuye, y podría ser debido a que el periodo de almacenamiento está por concluir, y los espermatozoides se preparan para ser eliminados (etapa POS1 y POS2). Para muestras de espermatozoides la Organización Mundial de la Salud (WHO 2010), categoriza a la movilidad en 3 categorías distintas: espermatozoides con movilidad progresiva, movilidad no progresiva e inmóviles, a diferencia de esto, estudios previos en *C. mexicanus*, únicamente los presentan como espermatozoides móviles e inmóviles. Rodríguez-Tobón *et al.* (2016), reportaron este parámetro en los meses de septiembre y octubre, donde la movilidad disminuyó de *caput* a *cauda*, teniendo porcentajes similares a lo obtenido en este trabajo.

El porcentaje de espermatozoides vivos también mostró algunas diferencias entre etapas del almacenamiento prolongado (PRE, COP, POS1, POS2), y entre regiones anatómicas epididimarias (*caput*, *corpus* y *cauda*). En el caso de las regiones anatómicas en PRE, la *cauda* mostró el mayor porcentaje de espermatozoides vivos ($95.33 \pm 1.76\%$), mientras que *caput* tuvo el menor porcentaje (82.6 ± 1.66) ($p < 0.05$). Durante la etapa de COP, no se encontraron diferencias significativas, se encontró el mismo comportamiento, un mayor porcentaje de células viables en *cauda* ($92 \pm 4.16\%$) y menor en *caput* ($78.3 \pm 1.45\%$). Para de POS1, tampoco se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre las regiones, el *corpus* presentó un valor promedio de 66.66

$\pm 6.93\%$ y la cauda un valor promedio mayor con $86.33 \pm 3.17\%$. En la etapa final POS2, la cauda mostró un valor promedio de $80.33 \pm 3.17\%$.

Así como sucede en murciélagos hibernantes que presentan un periodo de almacenamiento epididimario, y que una de sus principales características es la conservación de la viabilidad, en *C. mexicanus* nuestros resultados muestran altos porcentajes de células vivas desde el comienzo del almacenamiento epididimario hasta su conclusión (POS2). Esta característica puede deberse a lo que se ha reportado en especies hibernantes en donde una hiperosmolaridad permite que entren en un estado de quiescencia celular, reduciendo su metabolismo, conservando su energía y preservando su viabilidad (Crichton *et al.*, 1994; Crichton *et al.*, 1993). Sin embargo, en las etapas de POS1 y POS2, aunque el porcentaje de células vivas es mayor al 80%, ha disminuido respecto a las etapas anteriores, esto se debe posiblemente a que el periodo de almacenamiento está por concluir, y el epidídimo se encuentra en una etapa de eliminación de espermatozoides, en donde posiblemente en conjunto con marcadores de muerte celular está degradando a los espermatozoides, conduciéndolos a la muerte.

En cuanto a la concentración de células espermáticas en el epidídimo, en la etapa PRE se mostró la mayor cantidad de espermatozoides en cauda (192 ± 2.30 millones/mL) vs el *caput* la menor cantidad (9.33 ± 1.33 millones/mL) ($p < 0.05$). En COP se mostró el mismo comportamiento, una mayor concentración celular en cauda (201 ± 5.85 millones/mL) y menor en *caput* (4.66 ± 2.6 millones/mL). Posteriormente, en la etapa POS1, el *corpus* presentó una menor cantidad de células (3.33 ± 1.33 millones/mL) respecto a las encontradas en la cauda, con una concentración promedio de 57 ± 9.64 millones/mL ($p < 0.05$).

En la etapa final POS2, la cauda mostró un valor promedio de 16.33 ± 4.25 millones/mL. Rodríguez-Tobón *et al.* 2016, reportaron este parámetro en los meses de septiembre y octubre, encontrando primeramente presencia de células en las tres regiones, que disminuyen de *caput* a cauda. La mayor concentración reportada fue a finales del mes de octubre con 260 ± 65.1 millones/mL a nivel de cauda, que es mayor a los resultados

obtenidos en este estudio en esta misma fecha. Por otra parte, Cervantes et al. en 2008 en esta misma fecha reportaron a nivel de cauda 114.2 ± 20.5 millones/mL. En la región de *caput*, en las etapas de POS1 y POS2, así como en la región de *corpus* en la etapa de POS2, ya no se encuentran espermatozoides, debido al término de la espermatogénesis en el mes de septiembre, y la continuación del trayecto de las células hacia la región caudal (López-Wilchis, 1989).

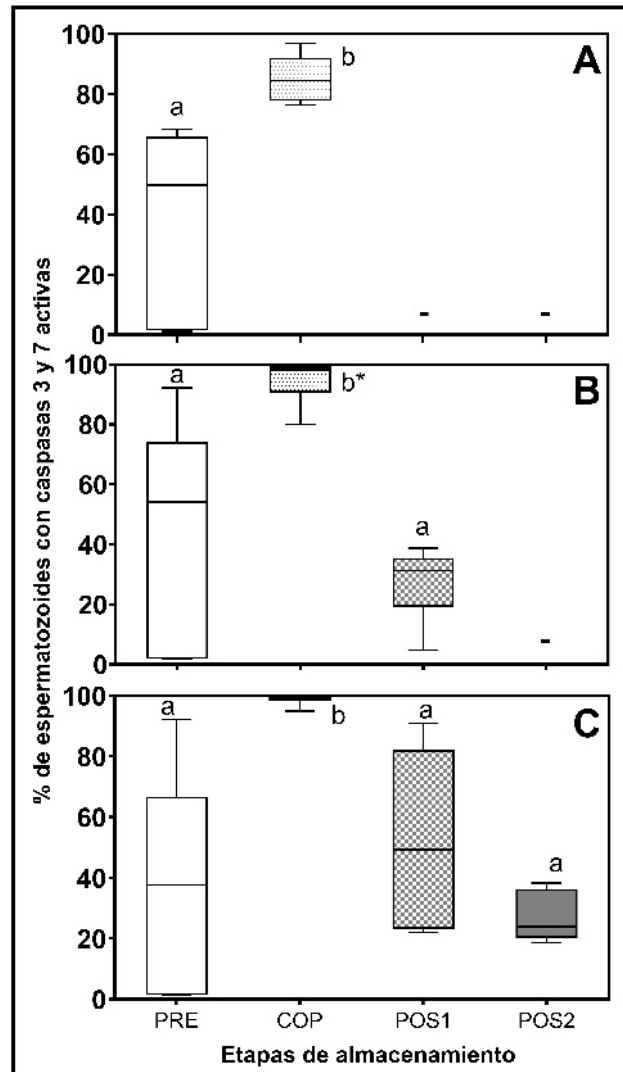
8.3 Caspasas 3 y 7 activas

En la gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos de caspasas 3 y 7 activas, marcadas con el kit FLICA, evaluadas con el citómetro de flujo. En la etapa PRE, no se encontraron diferencias significativas comparando las diferentes regiones del epidídimo. Sin embargo, el *corpus* presentó el mayor porcentaje de espermatozoides con actividad de caspasas, 54.13% (rango 90.55). En el caso del *caput* presento una mediana de 49.74% (rango 67.26), y el menor valor se mostró en la cauda, con una mediana de 37.64% (rango 90.85). En este momento, las células continúan su maduración epididimaria según lo reportado por Rodríguez-Tobón et al. (2016), por lo que en este momento, es posible que las caspasas 3 y 7 tengan una función no relacionada con la muerte celular, sino con la maduración espermática, como se había propuesto anteriormente por López-Trinidad (2017).

Una de los posibles mecanismos en los que estas caspasas pueden estar participando, es en la eliminación de la gota citoplasmática. La función de las caspasas se ha denominado como diferenciación terminal, y se ha reportado que se lleva a cabo en el proceso de espermiogénesis en *Drosophila*, teniendo su participación en la eliminación de citoplasma para que la célula espermática adquiera su morfología definitiva (Nhan et al., 2006). En *C. mexicanus* se ha reportado la presencia de gota citoplasmática en las tres regiones del epidídimo, siendo esta un indicador de maduración espermática. Cervantes et al. (2008), reportaron para el mes de octubre, un porcentaje de gota citoplasmática de 65.3 ± 5 %, valor que se encuentra cercano a los resultados de

caspasas activas obtenidos en este estudio, dando la posibilidad de una función para eliminar este residuo citoplasmático.

En la etapa COP, la cantidad de espermatozoides con caspasas activas aumenta considerablemente (respecto a la etapa previa), siendo mayor en la región caudal con una mediana de 99.59% (rango 4.89) y menor en *caput* con una mediana de 84.40% (rango 20.51) sin presentar diferencias estadísticas. En el caso del *corpus*, este presentó una mediana de 98.14% (rango 19.66). Para esta fecha, las caspasas ya se podrían considerar una señal de muerte celular, ya que iniciarían un proceso de muerte que culminaría en el tracto reproductor femenino. Esto concuerda con el porcentaje de espermatozoides que se ha reportado, siendo de 4.58 ± 0.33 millones/mL (Campos-Rentería, sin publicar), en comparación a lo que se encuentra a nivel de la región caudal, que llega a ser de más de 200 millones, por lo que se podría sugerir que la mayoría sale del epidídimo con la marca de caspasas que indicaría el inicio de la muerte del espermatozoide, y que culminara en la hembra.



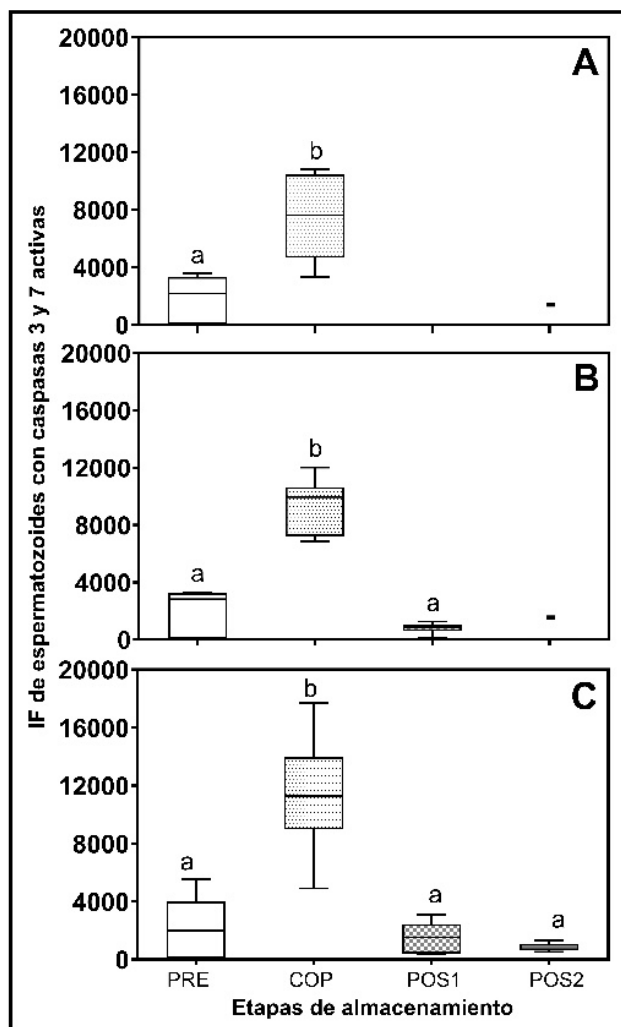
Gráfica 3. Porcentaje de espermatozoides con caspasas 3 y 7 activas en diferentes regiones del epidídimo A) *Caput*, B) *Corpus* y C) *Cauda*; durante el período de almacenamiento prolongado en *Corynorhinus mexicanus* en los meses de precópula: PRE (octubre), cópula: COP (diciembre), poscópula 1: POS1 (enero), Poscópula 2: POS2 (febrero); -: Sin espermatozoides. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compara entre etapas de almacenamiento de una misma región epididimaria y el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la región anatómica anterior. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post-hoc. $n=3$ murciélagos por etapa.

Posteriormente, la cantidad de células con actividad caspasa disminuye en la etapa POS1 respecto a COP, manteniéndose mayor en cauda con una mediana de 49.20% (rango 68.75) y menor en *corpus* con una mediana de 31.11% (rango 34.17), sin ser distinto entre ellos significativamente. Para la etapa final POS2, la actividad de las caspasas disminuye, presentando una mediana de 23.91% (rango 19.57). En estas fechas poscópula, los espermatozoides permanecerán en el epidídimo hasta que sean eliminados, por lo que, en esta etapa, las caspasas participarían únicamente como señal de muerte celular.

Se ha sugerido que, para que las caspasas puedan desempeñar funciones versátiles no letales se requieren niveles subletales de actividad de caspasa efectora, en oposición a la actividad completa que desencadena la apoptosis (Aram et al., 2017). En la gráfica 4 se muestran los resultados de IF obtenidos de caspasas 3 y 7 activas, marcadas con el kit FLICA, evaluadas por citometría de flujo. En PRE, el IF fue similar en las tres regiones, sin mostrar diferencias estadísticas ($p > 0.05$), el *caput* mostró una mediana de 2,175.999 (rango 3,536.736), el *corpus* mostró una mediana de 2,818.052 (rango 3,197.794) y la cauda una mediana de 20003.484 (rango 5,473.107). Los niveles presentes en esta etapa corresponderían a niveles subletales, participando en la maduración espermática, como caspasas con función de diferenciación terminal. Para que los niveles de caspasas se mantengan bajos, y puedan cumplir una función no letal, en *Drosophila* se ha reportado un mecanismo que estaría controlando esto. Se sugiere que un componente del ciclo de Krebs, la forma específica de ATP de la subunidad β de succinil-CoA sintetasa, A-S β , se une y activa CRL3, complejo requerido para la activación de caspasa en espermátidas. Esta interacción ocurre en la superficie mitocondrial, lo que limita la fuente de activación del complejo CRL3, y reduce la activación de caspasa en al menos un 60% (Aram et al., 2016).

En la etapa COP, los niveles son significativamente distintos en las tres regiones respecto a la etapa anterior, el *caput* mostró una mediana de 7,630.301 (rango 7,484.393), el *corpus* mostró una mediana de 9943.708 (rango 544.681) y la cauda una mediana de 11281.81 (rango 12,794.9). Estos niveles de IF corresponderían a

niveles letales, y tal como sucede con el porcentaje, las caspasas ya pueden comenzar a ser una señal de muerte celular. En esta etapa, al momento de copular, la mayoría de los espermatozoides llevarían la marca de muerte celular, así como los niveles requeridos para culminar su muerte en el tracto reproductor femenino. En la etapa de POS1, los valores bajan, el *corpus* muestra una mediana de 854.6011 (rango 1,147.894) y la cauda una mediana de 2,175.999 (rango 3,536.763) y en POS2 la cauda presenta una mediana de 701.0398 (rango 787.3326). En este momento las cópulas han finalizado, motivo por el cual los espermatozoides que permanecen en el epidídimo, únicamente serán eliminados.



Gráfica 4. Índice de fluorescencia de espermatozoides con caspasas 3 y 7 activas en diferentes regiones del epidídimo A) *Caput*, B) *Corpus* y C) *Cauda*; durante el período de almacenamiento prolongado en *Corynorhinus mexicanus* en los meses de precópula: PRE (octubre), cópula: COP (diciembre), poscópula 1: POS1 (enero), Poscópula 2: POS2 (febrero); -: Sin espermatozoides. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compara entre etapas de almacenamiento de una misma región epididimaria y el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la región anatómica anterior. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post-hoc. $n=3$ murciélagos por etapa.

Los resultados de la microscopía de fluorescencia no mostraron diferentes patrones de marcaje de la presencia de caspasas activas en el espermatozoide, siendo solamente la pieza media en donde se encontraba el marcaje (Figura 5). Anteriormente, la presencia de caspasas únicamente se reportaba como indicador de degeneración celular, y se relacionaba con la externalización de fosfatidilserina (Talarczyk-Desole *et al.*, 2016). Sin embargo, su presencia en espermatozoides vivos, tal como sucede en los resultados de este estudio, en la pieza media de los gametos no significa un marcador decisivo de muerte.

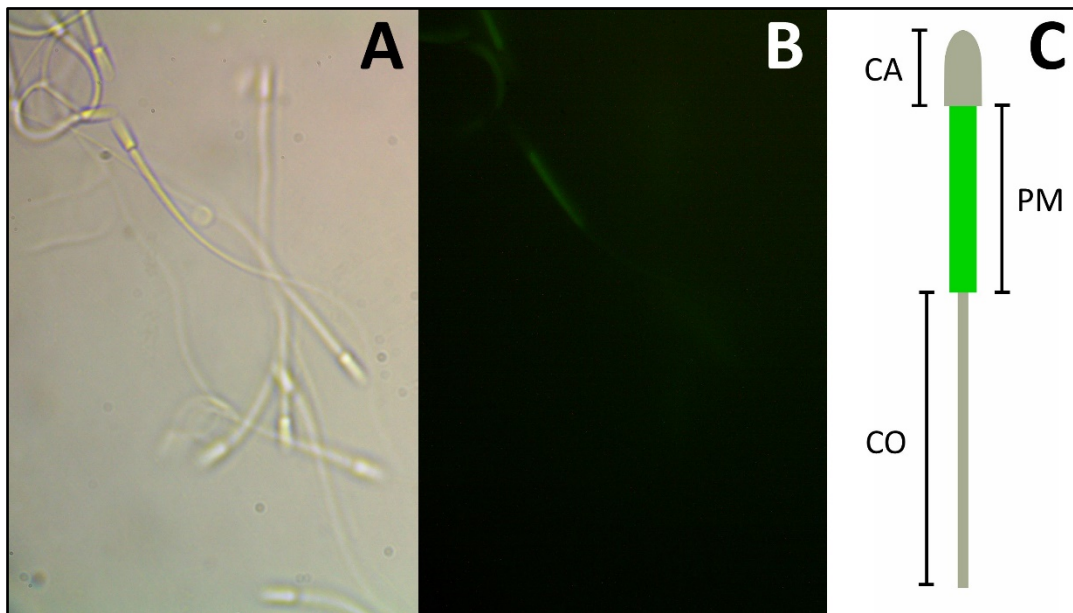


Figura 5. Marcaje de caspasas 3 y 7 activas en espermatozoides en *Corynorhinus mexicanus*, analizado en microscopía de epifluorescencia, donde se observa el marcaje el color verde en la región de la pieza media. A) campo claro 40X; B) luz UV 40X; C) esquematización de espermatozoide con pieza media marcada en verde. CA: cabeza; PM: pieza media; CO: cola.

8.4 Externalización de fosfatidilserina

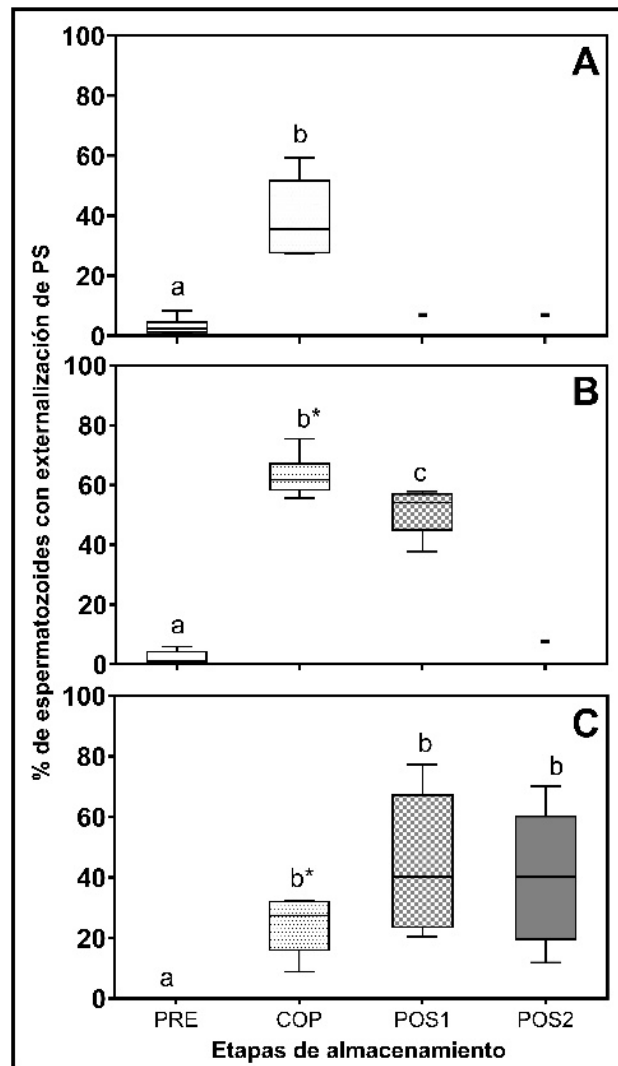
En la gráfica 5 se muestran los resultados obtenidos de los espermatozoides que presentaban externalización de fosfatidilserina marcados con Anexina V, evaluados por citometría de flujo. En la etapa PRE, en la región del caput se observó el mayor porcentaje de espermatozoides teñidos con Anexina V con una mediana de 2.40 (rango 7.79), y el menor porcentaje en cauda, con una mediana de 0.13 (rango 0.21) sin presentar diferencias estadísticas. En el caso del *corpus* presentó una mediana de 0.75% (rango 5.12). En este momento el bajo porcentaje de PS parecía indicar que no existe una relación con el reconocimiento del ovocito por parte del espermatozoide.

En la etapa COP, la cantidad de espermatozoides que presentan marcaje de Anexina V aumenta respecto a PRE, siendo mayor en la región de *corpus* con una mediana de 61.66 (rango 19.70), en *caput* se mostró una mediana de 35.54% (rango 32.08) y en

el caso de la cauda mostró el menor valor con una mediana de 29.81% (rango 81.07), presentando diferencias estadísticas entre regiones ($p < 0.05$). Se ha establecido de manera general que, la externalización de PS, comúnmente se utiliza como un indicador de muerte celular. Si embargo, se ha demostrado que tiene un papel en la fecundación. Rival et al. (2019), determinaron la exposición de PS en la región de la cabeza de los espermatozoides viables y móviles de ratón, además de un aumento progresivo durante su tránsito por el epidídimo, siendo mayor en la región de caudal.

Rival et al. (2019), realizaron experimentos en donde se interrumpió la acción de receptores de reconocimiento de PS (BAI1, CD36, Tim-4 y Mer-TK) en el ovocito, que fueron marcados basándose en los receptores que muestran los fagocitos para identificar a PS. Posteriormente realizaron pruebas de fecundación y se demostró que dichos receptores contribuyen a la fecundación, ya que, si eran interrumpidos, el porcentaje de fecundación se veía disminuido. Por lo que, estos datos demuestran que la externalización de PS en espermatozoides viables y en acción conjunta con los receptores de reconocimiento en los ovocitos, son participantes clave para la fusión de gametos. En conclusión, este estudio sugiere que la externalización de FS se lleva a cabo de manera progresiva en el epidídimo. Sin embargo, no como una señal de eliminación celular, si no como una modificación de la MP requerida para tener éxito en la fecundación.

Posteriormente, el porcentaje de células marcadas cae nuevamente en POS1 respecto a COP, en la región de *corpus* con una mediana de 54.03% (rango 20.10) y en cauda con una mediana de 2.40% (rango 7.79) sin ser distinto entre ellos significativamente ($p > 0.05$). En la etapa final POS2, se presenta un valor de mediana de 40.15% (rango 58.28). En estas dos últimas etapas, el marcaje a PS solamente puede tener una única función, la de señal de fagocitosis, pues el periodo de cópulas culminó y el de almacenamiento también, por lo que las células ya no tendrán ninguna función posterior.



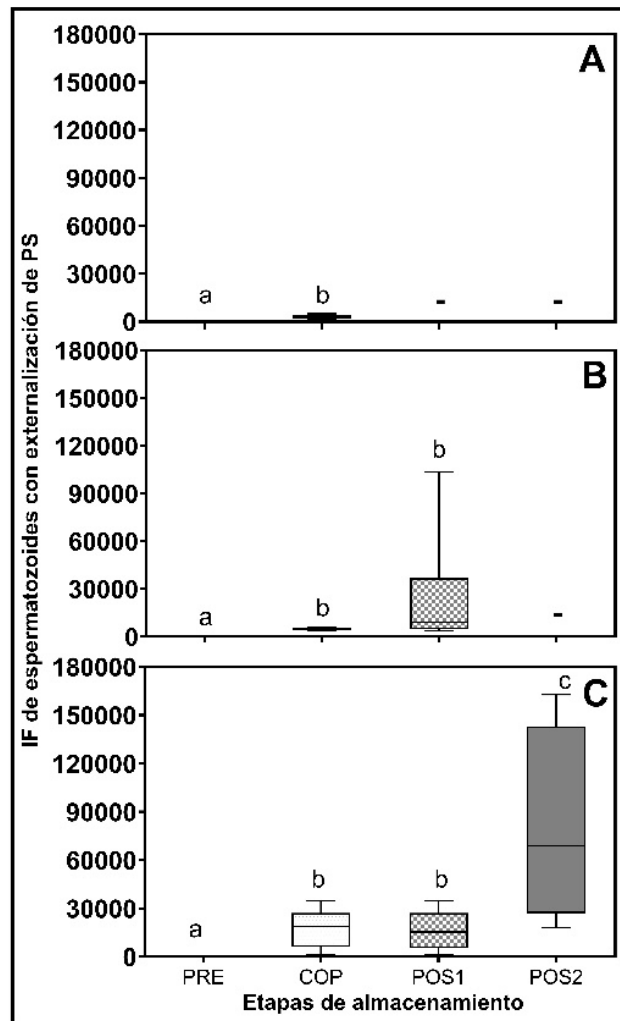
Gráfica 5. Porcentaje de espermatozoides con externalización de PS en las diferentes regiones A) *Caput*, B) *Corpus* y C) *Cauda* durante el almacenamiento de *Corynorhinus mexicanus* en los meses de precópula: PRE (octubre), cópula: COP (diciembre), poscópula 1: POS1 (enero), Poscópula 2: POS2 (febrero); -: Sin espermatozoides. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compara entre etapas de almacenamiento de una misma región epididimaria y el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la región anatómica anterior. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post-hoc. $n=3$ murciélagos por etapa.

Al igual que sucede con las caspasas 3 y 7, la cantidad de fosfatidilserina expuesta puede estar determinando una posible función, tal como se tiene reportado su presencia en las distintas regiones del espermatozoide (De Vries *et al.*, 2003; Gadella & Harrison, 2002). En la gráfica 6 se muestran los resultados del IF obtenidos de los espermatozoides marcados con el Anexina V evaluados con el citómetro de flujo. En la etapa de PRE el *caput* mostró una mediana de 111.7301 (rango 478.4353), el *corpus* una mediana de 33.10004 (rango 335.2917) y la cauda una mediana de 6.2675 (rango 18.6114). Estos niveles, así como su presencia en un porcentaje muy bajo de células, parecería no tener alguna función que pudiera afectar a la etapa, ya que también el porcentaje que lo presentan es muy bajo en comparación a las etapas posteriores.

En la etapa de COP el IF aumentó significativamente en las tres regiones, el *caput* mostró una mediana de 2989.018 (rango 3145.334), el *corpus* mostró una mediana de 4949.684 (rango 2526.807) y la cauda mostró el valor más alto, con una mediana de 18859.94 (rango 33382.98), sin ser distintos entre sí ($p > 0.05$). Con la reciente propuesta de PS y su función en la fecundación (Rival *et al.*, 2019), se ha buscado una diferencia con la PS que funcione como marcaje de muerte celular. Si bien, se ha descrito como se lleva a cabo la externalización de FS en eventos apoptóticos, mediados por acción de caspasas y flipasas/escramblasas, lo que sugieren Rival *et al.* (2019) en su estudio, no estaría ocurriendo en un evento apoptótico, por lo que es probable que la translocación de FS a la cara externa de la MP de los espermatozoides sea mediado por actividad de escramblasas, como ocurre en la capacitación. Se ha reportado que, durante la capacitación espermática, TEM16F, una escramblasa dependiente de Ca^{2+} , es la molécula involucrada para la externalización de este fosfolípido, y respondería a Ca^{2+} , ion involucrado durante este proceso (Nagata *et al.*, 2020).

Para POS1 el IF aumento significativamente, el *corpus* mostro una mediana de 9195.25 (rango 99771.11) y una mediana de 15324.72 (rango 33382.98) para cauda. En POS2 el IF presento aumentó, con una mediana de 68965.28 (rango 144717.5) en cauda. En este momento las células con este elevado IF, así como la fecha en que se

presenta, indicaría solamente una señal para ser fagocitadas. Por lo cual, el epidídimo debe ser el encargado de llevar a cabo un proceso de fagocitosis para eliminar a estas células marcadas, por lo que un análisis de sitios de reconocimiento de PS en células epididimarias profundizaría este mecanismo de eliminación.



Gráfica 6. Índice de fluorescencia de espermatozoides con externalización de PS en diferentes regiones del epidídimo A) *Caput*, B) *Corpus* y C) *Cauda*; durante el período de almacenamiento prolongado en *Corynorhinus mexicanus* en los meses de precópula: PRE (octubre), cópula: COP (diciembre), poscópula 1: POS1 (enero), Poscópula 2: POS2 (febrero); -: Sin espermatozoides. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compara entre etapas de almacenamiento de una misma región epididimaria y el asterisco

indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la región anatómica anterior. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post-hoc. $n=3$ murciélagos por etapa.

Los resultados de la microscopía de fluorescencia mostraron el marcaje en la región de la cabeza y la pieza media del espermatozoide (Figura 6). No se obtuvieron resultados de todas las etapas, debido a la falta de células, debido a que fueron utilizadas todas en citometría de flujo. La externalización de PS se ha reportado en conjunto con caspasas efectoras, manejándose como indicadores de degeneración celular (Talarczyk-Desole *et al.*, 2016). Sin embargo, su presencia se ha notado en espermatozoides vivos, y conforme a lo reportado, no significa únicamente una señal de muerte celular. La ubicación de la externalización del fosfolípido se ha relacionado con el estado celular. El marcaje en la región acrosomal y del flagelo, se han relacionado con células deterioradas, mientras que el marcaje en la región acrosomal, con células vivas intactas (De Vries *et al.*, 2003; Gadella & Harrison, 2002). En los resultados obtenidos en este estudio, el marcaje en la región de la cabeza, en relación los resultados de la viabilidad, confirmarían que son células vivas intactas.

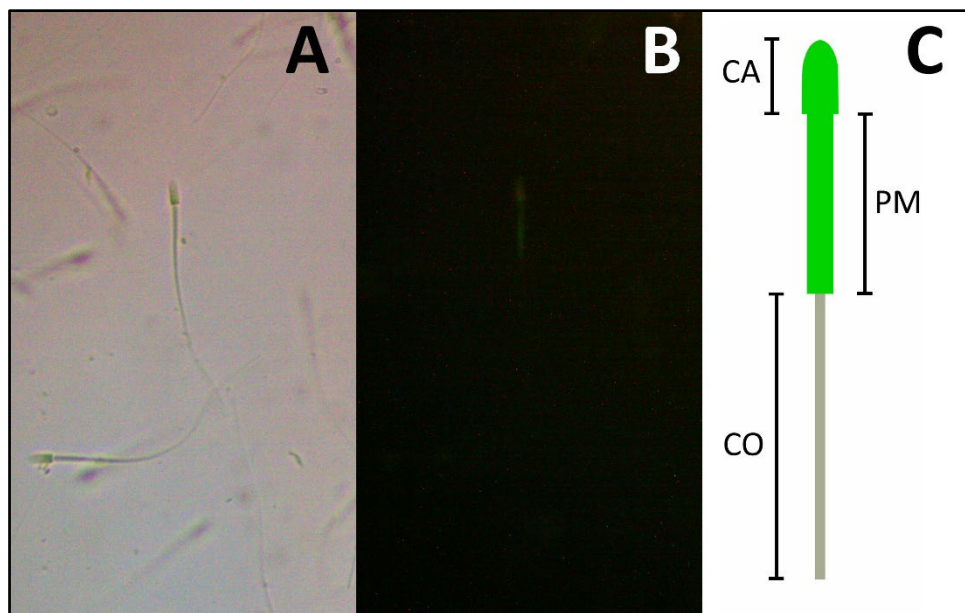


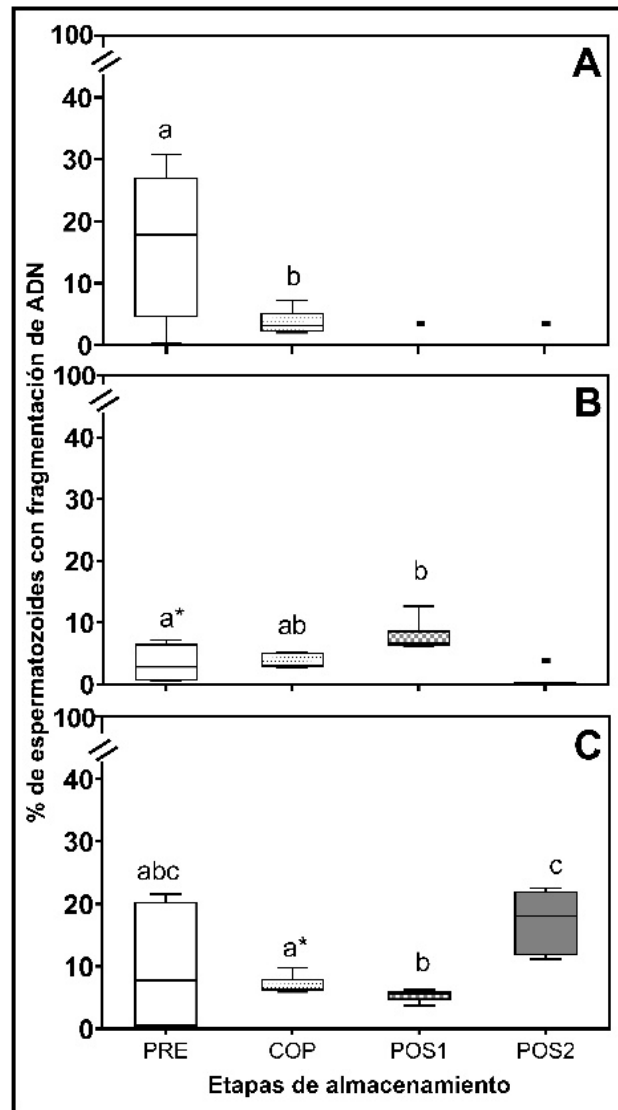
Figura 6. Marcaje de externalización de PS en espermatozoides en *Corynorhinus mexicanus*, analizado en microscopía de epifluorescencia, donde se observa el marcaje el color verde en

la región de la cabeza y de la pieza media. A) campo claro 40X; B) luz UV 40X; C) esquematización de espermatozoide con pieza media marcada en verde. CA: cabeza; PM: pieza media; CO: cola.

8.5 Fragmentación de ADN

En la gráfica 7 se muestran los resultados obtenidos de los espermatozoides teñidos con NA para identificar fragmentación de ADN, y evaluadas con el citómetro de flujo. En la primera etapa de estudio PRE, se observa el mayor porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado en el *caput* con una mediana de 17.78% (rango 30.45) y el menor en el *corpus* con una mediana de 2.79% (rango 6.65) siendo diferentes estadísticamente ($p < 0.05$). En el caso de la cauda, esta región presenta una mediana de 7.79% (rango 21.47). El daño encontrado en los espermatozoides durante esta etapa correspondería con el recién término del proceso de espermatogénesis en la especie (López-Wilchis, 1989), ya que se podrían encontrar espermatozoides que no culminaron la compactación de ADN durante este proceso. Se ha reportado previamente que, el daño al ADN disminuye de *caput* a cauda (De Jonge & Barratt, 2006), pero en nuestros resultados, este compartimento no se observa claramente de la misma manera.

Para la etapa de COP los valores disminuyen respecto a la etapa PRE, siendo significativo solo en *caput*. En esta etapa el mayor valor de espermatozoides con ADN fragmentado es en la región de cauda con una mediana de 6.33% (rango 3.85) y el menor el *corpus* con una mediana de 2.97% (rango 2.47), siendo distintos estadísticamente, en el caso del *caput* muestra una mediana de 3.10% (rango 5.19). Para este momento, en etapa de cópulas, los espermatozoides deben estar íntegros debido a la importancia de ésta, y los espermatozoides que presentaban el daño, ya fueron eliminados de la luz epididimaria por las células principales, como se ha reportado que ocurre en otras especies (Ramos-Ibeas *et al.*, 2013).



Gráfica 7. Porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN en las diferentes regiones: A) *Caput*, B) *Corpus* y C) *Cauda* durante el almacenamiento de *Corynorhinus mexicanus* en los meses de precópula: PRE (octubre), cópula: COP (diciembre), poscópula 1: POS1 (enero), Poscópula 2: POS2 (febrero); -: Sin espermatozoides. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compara entre etapas de almacenamiento de una misma región epididimaria y el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la región anatómica anterior. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post-hoc. $n=3$ murciélagos por etapa.

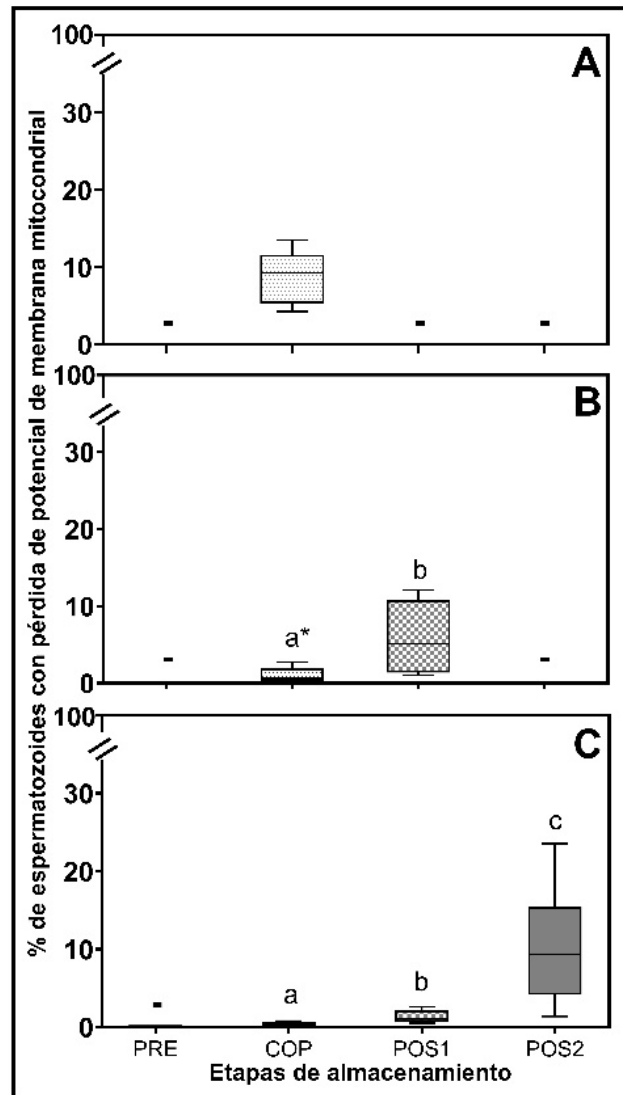
Durante POS1 el porcentaje de células con daño al ADN en la región de *corpus* del epidídimo aumenta significativamente presentando una mediana de 6.61% (rango 6.50) y en la región caudal hay una disminución no significativa, con una mediana de 5.62% (rango 2.50). En la última etapa POS2, se dispara el valor de la variable alcanzado una mediana de 18.08% (rango 11.39) en la cauda. Este valor final, correspondería a un daño ya no originado en testículo, si no, postesticular.

El análisis de la fragmentación del ADN genómico se analizó debido a que es un proceso que acompaña a la apoptosis y se considera un golpe final para la vitalidad de la célula (Larsen y Sørensen, 2017). A pesar de ser un evento relevante durante la apoptosis, la fragmentación del ADN de las células no es un requisito absoluto (Elliott *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2006), esto quizá este respondiendo porque no hay una similitud con los valores de los demás marcadores apoptóticos analizados. Aun así, la fragmentación del ADN parece mejorar la eficiencia general del proceso y puede ayudar a identificar a la célula en proceso de muerte para su eliminación por fagocitosis (Elliott *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2006). El daño al ADN puede ser originado por muchos factores, pero en relación a la apoptosis, se tiene bien identificado a la ADNasa activada por caspasa, que activa la CAD mediante la inactivación proteolítica del inhibidor de la CAD (ICAD) (Larsen y Sørensen, 2017). En análisis con naranja de acridina utilizado en este estudio, no permite identificar cual es la razón de este daño al ADN, por lo que análisis más detallados son necesarios, para sugerir cual podría ser la vía que provoca alteraciones en el ADN del espermatozoide.

Los valores de daño al ADN encontrados en la etapa de PRE y POS2, siendo los más elevados durante el estudio, al compararlos con otros estudios como el de López-Trinidad (2017), en donde se analizó el daño en ratas de laboratorio de distintas edades, no representa diferencias notables, mostrando porcentajes inferiores al 20%. De la misma forma, en eyaculados humanos, individuos sanos muestran porcentajes de daño al ADN inferiores al 20%, al compararse con individuos con patologías (Smith *et al.*, 2007).

8.6 Pérdida de potencial de membrana mitocondrial

En la gráfica 8 se muestran los resultados obtenidos de los espermatozoides con marcaje mitocondrial, para detectar una membrana mitocondrial intacta o dañada, marcados con Mitotracker Green y evaluados por citometría de flujo. En la etapa de COP, la región que presentó el mayor porcentaje de espermatozoides con membrana mitocondrial dañada fue el *caput* con una mediana de 9.27% (rango 29.84), siendo estadísticamente diferente a la cauda con una mediana de 0.13% (rango 0.75), en el caso del *corpus* mostró una mediana de 0.72% (rango 2.68). En la etapa POS1, el *corpus* mostró estadísticamente un aumento con una mediana de 8.42% (rango 11.01) que la cauda con una mediana de 1.11% (rango 2.10). En la etapa final POS2, el porcentaje de células con el potencial mitocondrial dañado aumentó significativamente alcanzado una mediana de 11.94% (rango 22.17) en la región caudal. Estos números indican que la pérdida de potencial de membrana mitocondrial no ocurre de manera significativa, en relación a los otros marcadores apoptóticos, por lo que implicaría que no se relaciona con la activación de caspasas efectoras, tal como sucede en un evento de señalización apoptótico (Palacios *et al.*, 2011).



Gráfica 8. Porcentaje de espermatozoides con pérdida de potencial de membrana mitocondrial en las tres regiones del epidídimo: A) *Caput*, B) *Corpus* y C) *Cauda* durante el período de almacenamiento de *Corynorhinus mexicanus* en los meses de precópula: PRE (octubre), cópula: COP (diciembre), poscópula 1: POS1 (enero), Poscópula 2: POS2 (febrero); -: Sin espermatozoides. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compara entre etapas de almacenamiento de una misma región epididimaria y el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la región anatómica anterior. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post-hoc. $n=3$ murciélagos por etapa.

Los cuatro marcadores apoptóticos analizados en los espermatozoides están presentes durante las tres etapas del almacenamiento epididimario prolongado de *C. mexicanus*. Este estudio, como el de López-Trinidad (2017), es uno de los pocos en los que se reporta la aparición de marcadores apoptóticos a lo largo del epidídimo. Sin embargo, aunque estos marcadores están presentes todo el tiempo, no se encuentran en los mismo niveles en las distintas etapas, por lo que no se estaría llevando a cabo una señalización apoptótica como se ha descrito previamente (Elmore, 2007; Galluzzi *et al.*, 2015; Green y Llambi, 2015; López-Trinidad *et al.*, 2016).

En la etapa de PRE, la presencia de caspasas efectoras, así como el valor de IF obtenido, no son similares a lo resultante de externalización de PS y pérdida de potencial de membrana mitocondrial, por lo que estas caspasas, en esta etapa, no estarían funcionando como una señal para el comienzo de una vía de muerte celular, como se ha reportado tradicionalmente, pues son las encargadas de efectuar la presencia de los otros marcadores (Fuchs y Steller, 2015; Gadella y Harrison, 2002; Nagata *et al.*, 2020 y Portella-Ruiz y Gonzales, 2016). Si bien, los valores obtenidos del daño al ADN en esta etapa (PRE), pueden tener mayor similitud a los valores de caspasas activas, no es clara una relación directa, ya que no se analizó la acción de la ADNasa activada por caspasa, molécula que indicaría una señalización apoptótica (Larsen y Sørensen, 2017).

Para la etapa de COP, el resultado de caspasas efectoras como el de externalización de PS, se ven en aumento. Sin embargo, continúan sin parecer tener alguna relación, ya que no hay similitudes en los valores, y la presencia de caspasas, parecería no tener una acción sobre la externalización de PS, en caso de seguir una vía de muerte celular (Fuchs y Steller, 2015; Gadella y Harrison, 2002; Nagata *et al.*, 2020 y Portella-Ruiz y Gonzales, 2016). En el caso del daño al ADN y la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, parecen no verse involucradas por el alto porcentaje de caspasas presentes. A pesar de esto, no se descarta que estas caspasas pueden ser el inicio para comenzar la señalización de muerte celular en la etapa siguiente del

almacenamiento (poscópula), donde los espermatozoides que continúen en el epidídimo deben de ser eliminados.

En la etapa de poscópula (POS1 y POS2), los valores de caspasas efectoras disminuyen en comparación a las etapas anteriores. Sin embargo, los otros tres marcadores apoptóticos se ven en aumento. Es posible que las caspasas presentes en la etapa de COP fueron el comienzo de la señalización apoptótica, que posteriormente continuaría en los últimos meses de almacenamiento prolongado, etapa en la que deben de existir señales para que el epidídimo elimine las células que no van a ser utilizadas. En POS1 y POS2 se muestra un aumento en los valores de externalización de PS, que en un proceso de muerte celular, es externalizada por caspasas 3 y 7 (Fuchs y Steller, 2015; Nagata *et al.*, 2020).

Los valores bajos de pérdida de potencial de membrana mitocondrial, que, parecen no ser significativos, no se descarta que puedan estar involucrados en un proceso de señalización apoptótica intrínseco (Palacios *et al.*, 2011). Por último, el daño presente en el ADN, aumenta respecto a la etapa anterior (COP), y es similar a la etapa de maduración (PRE). Sin embargo, el daño presente en poscópula no correspondería a un daño generado en el testículo, como puede ocurrir en PRE, respuesta del término de la espermatogénesis (López-Wilchis, 1989), sino, a un daño postesticular, que puede ser desencadenado por diversos factores (Barroso *et al.*, 2006; Portella-Ruiz y Gonzáles, 2016) y a pesar de que la técnica empleada para detectar el daño al ADN no determina una relación directa con las caspasas, no se descarta la participación de la ADNasa dependiente de caspasa en esta última etapa.

9. Conclusiones

Confirmamos la presencia de caspasas 3 y 7 en la etapa de maduración espermática epididimaria (etapa PRE) en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* durante el almacenamiento prolongado. El índice de fluorescencia en esta misma etapa (PRE) podría considerarse como niveles subletales, teniendo así una función en diferenciación terminal. Posterior a la maduración epididimaria (etapa COP, POS1 y

POS2), su presencia, así como el IF resultante, indicarían el comienzo de la muerte celular, por lo que se podrían considerar niveles letales de caspasa.

Se confirmó la externalización de fosfatidilserina durante la etapa de cópulas (COP), esto podría indicar su futura participación en la fecundación. En la etapa de poscópula, podría estar funcionando como señal de muerte celular.

Se encontró daño al ADN principalmente en precópula y poscópula, pero no se puede confirmar que tenga una relación directa con la señalización apoptótica.

La pérdida de potencial de membrana mitocondrial, parece no estar involucrada con la activación o presencia de los demás marcadores de muerte celular, por lo que no podría estar participando en la eliminación espermática.

10. Perspectivas

El análisis de proteínas específicas que inhiban la activación de caspasas efectoras evitando una cascada de muerte celular, podría ayudar a aclarar la participación de las caspasas en el proceso maduracional en el epidídimo.

El análisis de receptores de fosfatidilserina en las células del epitelio epididimario podría ayudar a conocer si el epidídimo lleva a cabo un proceso de fagocitosis como sucede en células somáticas durante un proceso de apoptosis.

11. Anexos

11.1 Soluciones

Solución Ringer: pH=7.2

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

Medio de capacitación: pH=7.4

- NaCl 95 mM
- KCl 5 mM
- CaCl₂ 1.7 mM
- KH₂PO₄ 1.1 mM
- MgSO₄ 7H₂O
- Dextrosa 5.5 mM
- NaHCO₃ 25 mM
- Ac. Pirúvico 0.33 mM
- Ac. Láctico 30 mM
- 0.1% de albumina sérica bovina (BSA)

12. Bibliografía

- Aitken, R. J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A. J., Lee, Y. H., & Baker, M. A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian Journal of Andrology*, 9(4), 554–564.
- Alvarez Gonçalves, C. V., Arellano, F. E., & Pérez Carrera, A. L. (2015). Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal. *Publicación Periódica Científico-Tecnológica*, 7, 21-37.
- Amann, R. P., & Howards, S. S. (1980). Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *The Journal of Urology*, 124(2), 211–215.
- Anónimo (2010). Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D.F., 39 pp.
- Apedaile, A. E., Garrett, C., Clarke, G. N., Johnston, S. A., & Baker, H. W. G. (2004).

- Flow cytometry and microscopic acridine orange test: relationship with standard semen analysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 8(4), 398–407.
- Aram, L., Braun, T., Braverman, C., Kaplan, Y., Ravid, L., Levin-Zaidman, S., & Arama, E. (2016). A Krebs cycle component limits caspase activation rate through mitochondrial surface restriction of CRL activation. *Developmental Cell*, 37(1), 15–33.
- Aram, L., Yacobi-Sharon, K., & Arama, E. (2017). CDPs: caspase-dependent non-lethal cellular processes. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1307–1310.
- Arama, E., Agapite, J., & Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 4(5), 687–697.
- Arenas-Ríos E. (2017). *Reproductive Biology, Physiology and Biochemistry of Male Bats* (1st ed.). México: Bentham Science Publishers Ltd.
- Arenas-Ríos, E. (2009). Enzimas anti-especies reactivas de oxígeno, como reguladores en los procesos de espermatogénesis maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Tesis doctoral. *Universidad Autónoma Metropolitana México*. D.F.
- Arenas-Ríos, E., León-Galván, M. A., Mercado, P. E., & Rosado, A. (2005). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase during epididymal maturation and prolonged storage of spermatozoa in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Canadian Journal of Zoology*, 83(12), 1556–1565.
- Arenas-Ríos, E., Rodríguez-Tobón, A., & León-Galván, M. Á. (2017). Epididymal Sperm Maturation in Bats. *Reproductive Biology, Physiology and Biochemistry of Male Bats*, 1, 74–102.
- Awano, M., Kawaguchi, A., & Mohri, H. (1993). Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(2), 375–383.

- Barroso, G., Taylor, S., Morshedi, M., Manzur, F., Gaviño, F., & Oehninger, S. (2006). Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertility and Sterility*, *85*(1), 149–154.
- Cervantes, M. I., Arenas-Ríos, E., Miguel Ángel, L.-G., Ricardo, L.-W., Demetrio, A., & Adolfo, R. (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *54*(4–5), 196–204.
- Cooper, T G. (1998). Epididymis. In *Encyclopedia of reproduction* (Vol. 2, pp. 1–17). Academic Press San Diego.
- Cooper, Trevor G, Yeung, C.-H., Jones, R., Orgebin-Crist, M.-C., & Robaire, B. (2002). Rebuttal of a role for the epididymis in sperm quality control by phagocytosis of defective sperm. *Journal of Cell Science*, *115*(1), 5–7.
- Crichton, E. G. (2000). Sperm storage and fertilization. In *Reproductive biology of bats* (pp. 295–320). Elsevier.
- Crichton, E. G., Hinton, B. T., Pallone, T. L., & Hammerstedt, R. H. (1994). Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *267*(5), R1363–R1370.
- Crichton, E. G., Krutzsch, P. H., & Yanagimachi, R. (1993). Stability of the sperm plasma membrane of hibernating bats (*Myotis velifer*) compared with other mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*, *97*(1), 1–4.
- Crichton, E. G. & Krutzsch, P. H. (2000). *Reproductive biology of bats*. Academic Press.
- Dacheux, J.L., & Dacheux, F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, *147*(2), R27–R42.
- 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.
- De Jonge, C. J., & Barratt, C. (2006). *The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration*. Cambridge University Press.
- De Vries, K. J., Wiedmer, T., Sims, P. J., & Gadella, B. M. (2003). Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biology of Reproduction*, 68(6), 2122–2134.
- Ecroyd, H., Asquith, K. L., Jones, R. C., & Aitken, R. J. (2004). The development of signal transduction pathways during epididymal maturation is calcium dependent. *Developmental Biology*, 268(1), 53–63.
- Eddy, E. M., & O'Brien, D. (2006). The spermatozoon. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 1, 3–54.
- Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Sharma, P. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), 282–286.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Fàbrega, A., Puigmulé, M., Yeste, M., Casas, I., Bonet, S., & Pinart, E. (2011). Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 76(7), 1356–1366.
- Ford, W. C. L. (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, 10(5), 387–399.
- Foresta, C., Garolla, A., Cosci, I., Menegazzo, M., Ferigo, M., Gandin, V., & De Toni, L. (2014). Role of zinc trafficking in male fertility: from germ to sperm. *Human*

reproduction, 29(6), 1134-1145.

Fuchs, Y., & Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(6), 329–344.

Gadella, B. M., & Harrison, R. A. P. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction*, 67(1), 340–350.

Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., ... Annicchiarico-Petruzzelli, M. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 58.

Gopalakrishna, A., & Bhatia, D. (1980). Storage of spermatozoa in the epididymis of the bat, *Hipposideros speoris* (Schneider). *Current Science*, 49(24), 951–953.

Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a006080.

Gustafson, A. W. (1979). Male reproductive patterns in hibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56(1), 317–331.

Hamamah, S., & Gatti, J.-L. (1998). Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction*, 13(suppl_4), 20–30.

Hermo, L., Adamali, H. I., & Andonian, S. (2000). Immunolocalization of CA II and H⁺ V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *Journal of Andrology*, 21(3), 376–391.

Hernández, M. T., Sabanero, M. L., & Barbosa, G. (2006). Estaurosporia y Dexametasona, inductores apoptóticos en células coriónicas y transformadas. In *2° Congreso Nacional de Química Médica* (p. 6). Querétaro, Qro., México.

- Hernández, O., & Rosado, A. (1988). Biología molecular del espermatozoide humano. *Ciencia*, 39, 249–260.
- Holland, M. K., Vreeburg, J. A. N., & Orgebin-Crist, M. (1992). Testicular regulation of epididymal protein secretion. *Journal of Andrology*, 13(3), 266–273.
- Huang, Y., Chung, Y.-W., & Wong, P. Y. D. (1999). Potassium channel activity recorded from the apical membrane of freshly isolated epithelial cells in rat caudal epididymis. *Biology of Reproduction*, 60(6), 1509–1514.
- Johnson, L., & Varner, D. D. (1988). Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biology of Reproduction*, 39(4), 812–817.
- Jones, R. (2004). Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biology of Reproduction*, 71(5), 1405–1411.
- Karim, K. B., & Banerjee, S. (1985). Storage of spermatozoa in the epididymis of the tropical bat, *Rhinopoma hardwickei-hardwickei* (GRAY). In *Anatomical Record* vol. 211, pp. a95–a95.
- Krebs, J., & Davies, N. (1993). Sexual conflict and sexual selection. In *An Introduction to Behavioral Ecology*. (Blackwell). Oxford.
- Krishna, A., & Singh, K. (1997). The relationship between testicular activity, accessory sex glands, and circulating steroid concentration during the reproductive cycle in a male Indian vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Canadian Journal of Zoology*, 75(7), 1042–1050.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H. Green, D. R. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3.
- Kruttsch, P. H. (2009). The reproductive biology of the cave myotis (*Myotis velifer*).

Acta Chiropterologica, 11(1), 89–104.

Kunz, T. H., & Anthony, E. L. P. (1982). Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 63(1), 23–32.

Larsen, B. D., & Sørensen, C. S. (2017). The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *The FEBS Journal*, 284(8), 1160–1170.

Légaré, C., Thabet, M., Picard, S., & 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. *Biology of Reproduction*, 64(2), 720–727.

León-Galván, M. A. (2008). Participación de la muerte celular por apoptosis durante la espermatogénesis en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma Metropolitana*. México. D.F.

León-Galván, M. A., Fonseca, T., López-Wilchis, R., & Rosado, A. (1999). Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Canadian Journal of Zoology*, 77(1), 7–12.

León-Galván, M. A., López-Wilchis, R., Hernández-Pérez, O., Arenas-Ríos, E., & Rosado, A. (2005). Male reproductive cycle of Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *The Southwestern Naturalist*, 50(4), 453–460.

Lewis, B., & Aitken, J. R. (2001). Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 64(5), 1545–1556.

López-Trinidad, B. P. (2017). *Marcadores Apoptóticos en espermatozoides epididimarios de rata y su relacion con el envejecimiento*. Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma Metropolitana*. México, CDMX.

- López-Trinidad, B. P., Konigsberg, M., & Ávalos-Rodríguez, A. R.-T. (2016). Apoptosis en espermatozoides. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 6, 22-27.
- López-Wilchis, R. (1989). *Biología de Plecotus mexicanus (Chiroptera: Vespertilionidae) en el estado de Tlaxcala, México. Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.*
- López, L. O., Vila, E. O., Domínguez, P. L., Segovia, A. G., Gómez, I. O., Calonge, R. N., & Peregrín, P. C. (2010). Comparación entre el test de fragmentación de ADN espermático mediante la técnica de SCD y el índice de vitalidad medida con el test de naranja de acridina. *Revista Internacional de Andrología*, 8(3), 114–121.
- Medellín, R., Arita, H. T., & Sánchez, O. (2008). *Identificación de los murciélagos de México, guía de campo* (2nd ed.). México: Instituto de Ecología, UNAM. México.
- Nagata, S., Sakuragi, T., & Segawa, K. (2020). Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Current Opinion in Immunology*, 62, 31–38.
- NagDas, S. K., Winfrey, V. P., & Olson, G. E. (2000). Identification of a hamster epididymal region-specific secretory glycoprotein that binds nonviable spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1428–1436.
- Naz, R. K., & Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 75.
- Nhan, T. Q., Liles, W. C., & Schwartz, S. M. (2006). Physiological functions of caspases beyond cell death. *The American Journal of Pathology*, 169(3), 729–737.
- NOM-059. (2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010: Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la

- eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426–436.
- Olson, G. E., Winfrey, V. P., NagDas, S. K., & Melner, M. H. (2004). Region-specific expression and secretion of the fibrinogen-related protein, fgl2, by epithelial cells of the hamster epididymis and its role in disposal of defective spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51266–51274.
- Otani, T. (2014). Editorial Comment to Silodosin improved spontaneous ejaculation induced by mental strain. *International Journal of Urology*, 21(8), 841–842.
- Palacios, E., Miró, M. J., & Boticario, C. (2011). Muerte celular y Cáncer: Las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia celular. *Anales de La Real Academia de Doctores de España*, 15(2), 191–215.
- Pfeiffer, B., & Mayer, F. (2013). Spermatogenesis, sperm storage and reproductive timing in bats. *Journal of Zoology*, 289(2), 77–85.
- Portella-Ruiz, J., & Gonzales, G. F. (2016). Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecol Obstet Mex*, 84(7), 455–461.
- Racey, P. A. (1979). The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56(1), 391–402.
- Racey, P. A., & Entwistle, A. C. (2000). Life-history and Reproductive Strategies of Bats. In E. G. C. y P. H. Krutzsch (Ed.), *Reproductive Biology of Bats* (pp. 363–401). Academic Press.
- Ramos-Ibeas, P., Pericuesta, E., Fernandez-Gonzalez, R., Ramirez, M. A., & Gutierrez-Adan, A. (2013). Most regions of mouse epididymis are able to phagocytose immature germ cells. *Reproduction*, 146(5), 481–489.
- Redmond, D. E., Kosten, T. R., & Reiser, M. F. (1983). Spontaneous ejaculation associated with anxiety: psychophysiological considerations. *The American*

Journal of Psychiatry.

- 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.
- Robaire, B., Hinton, B. T., & Orgebin-Crist, M.-C. (2006). The epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 1071–1148). Elsevier.
- Robaire, B., & Viger, R. S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction*, *52*(2), 226–236.
- Rodríguez-Tobón, A. (2011). Análisis macro y micro estructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma Metropolitana México*. D.F
- 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.
- 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.
- Setchell, B., & Breed, W. (2006). *Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract*. Elsevier.
- Sidhu, K. S., Mate, K. E., Gunasekera, T., Veal, D., Hetherington, L., Baker, M. A., ... Rodger, J. C. (2004). A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum

- (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction*, 127(1), 95–103.
- Sikes, R. S., & Gannon, W. L. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92(1), 235–253.
- Simmons, N. B. (2005). Order Chiroptera. In *Mammals species of the World: a taxonomic and geographic reference* (3), pp. 312–529.
- Singh, K., & Krishna, A. (1995). Inhibitory effects of melatonin on testosterone but not on androstenedione production during winter in the vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Journal of Pineal Research*, 19(3), 127–132.
- Smith, R., Kaune, H., Parodi Ch, D., Madariaga, M., Morales, I., Ríos, R., & Castro, A. (2007). Aumento del daño en el ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptorquidismo. *Revista médica de Chile*, 135(3), 279-286.
- Sullivan, R., Frenette, G., & Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology*, 9(4), 483–491.
- Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 22(5), 574–587.
- Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W. E., & Schatten, G. (2001). A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science*, 114(9), 1665–1675.
- Talarczyk-Desole, J., Kotwicka, M., Jendraszak, M., Pawelczyk, L., Murawski, M., & Jędrzejczak, P. (2016). Sperm midpiece apoptotic markers: impact on fertilizing potential in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Human Cell*, 29(2), 67–75.

- Tash, J. S., & Bracho, G. E. (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *Journal of Andrology*, 15(6), 505–509.
- Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., & Aitken, R. J. (2001). Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 65(4), 1102–1113.
- WHO. (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. *World Health Organization, Geneva*, 7–113.
- Wimsatt, W. A. (1960). Some problems of reproduction in relation to hibernation in bats. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 124, 259–270.
- Yan, B., Wang, H., Zhuo, D., Li, F., Kon, T., Dewhirst, M., & Li, C. Y. (2006). Apoptotic DNA fragmentation factor maintains chromosome stability in a P53-independent manner. *Oncogene*, 25(39), 5370–5376.
- Yasien, H. A., & Attia, A. M. (2010). Spontaneous ejaculation after spinal cord trauma. *Asian Journal of Andrology*, 12(4), 609.