



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00093

Matrícula: 2183806584

PAPEL DE LAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASA, CATALASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA DURANTE EL ALMACENAMIENTO PROLONGADO DE ESPERMATOZOIDES EN EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO DE *Corynorhinus mexicanus*.



ANGIE CAROLINA CAMPOS RENTERIA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 13:00 horas del día 5 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. PABLO ARTURO SALAME MENDEZ
DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN
DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA
DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

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:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ANGIE CAROLINA CAMPOS RENTERIA

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 a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. PABLO ARTURO SALAME MENDEZ

VOCAL

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

VOCAL

DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA

SECRETARIO

DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

TESIS

**Papel de las enzimas antioxidantes en el fluido genital femenino del murciélago
Corynorhinus mexicanus, durante el almacenamiento prolongado de
espermatozoides.**

PRESENTA:

BIÓL. ANGIE CAROLINA CAMPOS RENTERÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

TUTORA:

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

ASESORES:

DR. PABLO ARTURO SALAME MÉNDEZ

DR. AHIEZER RODRÍGUEZ TOBÓN

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Edith Arenas Ríos

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Biología de la Reproducción. Laboratorio de Bioquímica y Morfofisiología del Espermatozoide.

arenas2000@yahoo.com.mx

ASESORES

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Biología de la Reproducción. Laboratorio de Ecofisiología Animal.

asam@xanum.uam.mx

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Biología. Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos.

ahiezerrod@yahoo.com.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Biología. Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos.

ahiezerrod@yahoo.com.mx

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Biología de la Reproducción. Laboratorio de Ecofisiología Animal.

asam@xanum.uam.mx

Dr. Julio César Chávez Zamora.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular.

julio.chavez@mail.ibt.unam.mx

Dr. Miguel Ángel León Galván

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Biología. Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos.

leon@xanum.uam.mx

Este proyecto se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Gracias al financiamiento del acuerdo UAM-I-CA-136 Factores celulares, Genético y Endocrinos Relacionados con Alteraciones en la Maduración Espermática.

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad. Programa 003797 del CONACyT. Este trabajo contó con el apoyo económico del proyecto “Ecofisiología reproductiva de vertebrados” a cargo del Dr. Miguel Ángel León Galván, así como, para la alumna por parte de la UAM (Programa de Becas de Posgrado), y del CONACyT.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00093

Matrícula: 218380684

PAPEL DE LAS ENZIMAS
SUPERÓXIDO DISMUTASA,
CATALASA Y GLUTATIÓN
PEROXIDASA DURANTE EL
ALMACENAMIENTO PROLONGADO DE
ESPERMATOZOIDES EN EL TRACTO
REPRODUCTOR FEMENINO DE
Corynorhinus mexicanus.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 13:00 horas del día 5 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. PABLO ARTURO SALAME MENDEZ
DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN
DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA
DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

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:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ANGIE CAROLINA CAMPOS RENTERIA

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

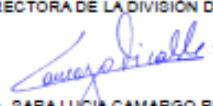
APROBAR

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


REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES


DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS


DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE


PRESIDENTE


DR. PABLO ARTURO SALAME MENDEZ


VOCAL


DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

VOCAL


DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA

SECRETARIO


DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme existir y regalarme en cada día una oportunidad para aprender.

Quiero agradecer a mis padres por siempre creer en mí, por apoyarme y alentarme cuando más lo necesito. Gracias mamá por exigirme tanto, porque aunque a veces no lo entendía, hoy me doy cuenta que lo has hecho con todo el amor del mundo. Gracias por toda tu paciencia, por regalarme tu tiempo desde niña incluso cuando te sentías cansada o triste, siempre estabas para mí. Todo lo que sé es gracias ti y no pude ser más afortunada al tenerte como mamá, la mejor del mundo. Gracias por incentivarme a ser cada día mejor persona, superarme y vencer cada reto en el camino, pero siempre recordándome que todos somos iguales, que tengo que ayudar a otros y que la humildad nos debe representar, sin importar los grados o cuantos logros, la gratitud y la humildad serán siempre los sellos que nos caracterizarán como seres humanos y no como simples hombres. Este y todos mis logros son y serán tuyos, porque yo sólo soy el reflejo de la persona más dedicada, sabia, perseverante, soñadora, apasionada, honesta y bondadosa que existe. Mi madre me contó que cuando decidió tener hijos, ella los educaría como piensa que debe ser el mundo. No sé si lo he logrado, pero quiero que te sientas orgullosa de mí. Gracias a ti realicé el sueño de ser “investigadora de bichos”, de esa forma llamaba a mi interés por la naturaleza desde los 6 años y tú alimentabas cada día esas ganas de seguir descubriéndola. Citando brevemente una anécdota, recuerdo que a los 7 me llevaste a la biblioteca para solicitar la enciclopedia de educación reproductiva para niños, estaba maravillada y tú conmigo, explicándome con entusiasmo y cariño pero con toda honestidad y realismo. Mamá, te dedico cada logro y cada paso, porque sin ti jamás lo hubiera logrado.

Gracias papá por haber dado tu vida por mi hermana y por mí. Desde niña te recuerdo trabajando muy duro, que incluso llegue a reprocharte el tiempo que me hacías falta. Hoy entiendo que sin ti no habría logrado nada de lo que ahora he hecho, pues sacrificabas hasta tus días de descanso por seguir trabajando y que no

nos faltara nada. Gracias, papá, por cada paso que has dado conmigo, gracias por corregirme cuando lo he necesitado y por entenderme cuando tomo decisiones diferentes a las tuyas. Me siento la persona más dichosa de tener al mejor padre del mundo, siempre serás mi héroe y espero poder llegar a ser como tú, el más honesto que he conocido. Siempre tendré presente, cuando un día charlando me dijiste “Tuviste el gran regalo y dicha de estudiar, de aprender y adquirir conocimiento; ahora tu obligación es enseñar a otros, transmitir lo que sabes y ayudar siempre que puedas. Nunca te guardes lo que la escuela te obsequió, enseña, desinteresadamente y sin alardear, a los demás, pero sobre todo recuerda que este mundo es un buffet para que aprendas lo que quieras, eso te dará libertad y podrás romper las cadenas que esclavizan a otros”.

Gracias hermana por darme la fuerza para enfrentar cualquier situación. Siempre me has cuidado y protegido, has estado a mi lado en mis noches de miedo, desesperación, incluso cuando he estado a punto de rendirme eres tú quien me levanta para seguir caminando. Haces de las adversidades enseñanzas y moralejas. Aun cuando eres la menor, has cuidado más de mí que yo de ti. He escuchado la expresión “solos llegamos y solos nos iremos”, yo en cambio llegue a esta vida contigo y sé que siempre nos tendremos la una a la otra. Tenerte a mi lado es lo más hermoso de mi vida, Andrea. Gracias a Perlita porque después de una jornada larga y pesada, cuando muchas veces llegué agotada o estresada, recibí de ti amor y cariño, moviendo tu colita me demostrabas cuanto gusto te daba verme y lo mucho que disfrutabas las noches, porque era el momento en que todos nos reuníamos a cenar; más que una mascota siempre has sido nuestra familia.

Gracias Fernando Salgado por ser el amor de mi vida. Has sido la persona que más ha creído en mí. Muchas veces tuve que salir muy tarde del laboratorio y en fines de semana tenía una tremenda carga de trabajo. Sin embargo, siempre estabas ahí, no sólo en palabras. Me esperaste hasta noche en la escuela, para que estuviera lo más segura posible y llegar con bien a casa. Por más trabajo que ambos tuviéramos, acordamos jamás posponer nuestro horario de comida, y era como un “reset”, estar

contigo me hace sentir la mujer más feliz y amada del mundo. Me enseñaste algo fundamental durante estos años, que nadie más te lo enseña: priorizar. Gracias por el equipo tan completo y tan hermoso que somos. Eres el más consentidor y durante mi estancia escolar jamás faltaban mis colaciones. Eres un ejemplo para mí, porque además de ser mi amor, como biólogo e investigador, me enseñas lo que sabes tratando de allanar el camino y que sea un poco más fácil para mí. Me desafías, me incentivas y me alientas a ser cada día mejor, con nuestros debates interminables sobre distintos temas. Te tengo una admiración infinita, y de verdad te agradezco la paciencia que me tienes. Te amo con todo mi ser. Cada día de mi vida y cada decisión es pensando en nosotros.

Gracias a toda mi familia por su amor enorme, por la paciencia, el apoyo, por los cuidados y atenciones. Gracias tía Esther Rentería por quererme tanto, por tratarme como una hija. Gracias tío Alejandro Rentería por todo tu amor y toda tu confianza, sé que siempre estarás con mi familia y conmigo. Gracias tío Roberto Rentería por tu cariño, por tus llamadas diarias, por hacerme reír y olvidarme de las cosas desagradables que en ocasiones nos ocurren. Gracias Tía Blanca Valdez por todo tu amor, por enseñar a tus hijos, a mi hermana y a mí que somos una familia, que somos hermanos y que siempre debemos procurarnos. Gracias tío Toño por todo el amor, por creer en mí, donde quiera que estés quiero que sepas que también te dedico este logro. Gracias tío Ricardo Campos por tus besos, tus abrazos, tus cariños, tu empatía, tu paciencia; eres un padre para mí y sé que me amas como a una hija. En mi vida y mis decisiones siempre estarás presente.

Gracias a cada uno de mis amigos por la empatía, el amor y el cariño. A pesar de que fueron dos años en los que casi no los frecuenté, siempre me apoyaron y entendían porque en ocasiones no podía asistir a reuniones. Siempre que los necesito están para apoyarme. De verdad gracias por cada sonrisa, por cada oración que hicimos juntos cuando teníamos miedo. Gracias por recibirme en su familia como miembro de ella y por celebrar cada paso que damos en este camino llamado vida.

Agradezco enormemente a la Dra. Edith Arenas Ríos por todo el apoyo durante el proyecto. A pesar de que nos tocaron momentos difíciles desde el sismo de 2017, usted buscó la manera de conseguir un espacio cómodo y con el equipo necesario para el desarrollo de sus alumnos. Gracias al Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón y al Dr. Arturo Salame Méndez por compartir sus conocimientos conmigo, por exigirme y motivarme.

Gracias Al laboratorio de “Morfofisiología y bioquímica del espermatozoide”, por acogerme en su familia y darme las herramientas para realizar mi proyecto. Gracias Al laboratorio de “Biología de mamíferos”, por el apoyo en salidas al campo.

Gracias al Dr. Ricardo López Wilchis porque a pesar de no haber sido su alumna estrictamente, siempre estuvo abierto a orientarme y resolver mis dudas.

Al Doctor Miguel Ángel León Galván le agradezco enormemente todo lo que sé. Gracias por enseñarme este fascinante mundo de los murciélagos y por compartir su conocimiento desde la licenciatura. Lo más bonito que aprendí de usted, y que quiero llevarlo siempre, es que no importan los grados académicos que uno tenga, la sencillez y la humildad deberán ir primero. Recuerdo que una ocasión lo encontré en los pasillos de la universidad, me preguntó sobre mi avance y platicamos de mis clases. Siempre voy a recordar lo que me dijo aquella vez: “Angie, quiero pedirte un favor. La maestría es una etapa muy interesante y te vas a enfrentar a muchas cosas, aprenderás a trabajar en un laboratorio y pasaras más tiempo ahí de lo que estás en casa, leyendo de procesos y realizando experimentos. Mas nunca olvides porque eres bióloga. Sigue sorprendiéndote, disfruta lo que haces, aprende con entusiasmo y lee por curiosidad, no por obligación; haz las cosas con empatía anteponiendo la vida del ser vivo con el que trabajes, respétalo; pero sobre todo nunca pierdas el asombro”.

Agradezco a los biólogos Beda Benito, Julio Gonzáles y Verónica Flores por el apoyo en campo. A Rafael Toledo por ayudarme a la estandarización de técnicas en el

laboratorio y la disposición para resolver dudas y asesorarme. A mis compañeros del laboratorio y de generación por compartir este camino.

Por último, a mis abuelos les dedico, no sólo esto, si no cada día de mi vida. Gracias por ese amor tan alcahuete que siempre me tuvieron. Con ustedes pasé los días más hermosos de mi vida. Me corrigieron cuando debieron y me amaron incondicionalmente. Papá Ché, todos los días te pienso y aunque a veces me da nostalgia porque quisiera enseñarte que hoy pude terminar este posgrado, luego sonrió porque sé que sigues conmigo, y me hace feliz entender que vivirás para siempre en mí, a través de tus enseñanzas, de los valores que me mostraste, de cada recuerdo juntos, de cada beso y abrazo, cada salida al parque, al súper, cada dulce, cada viernes de futbol. A mi mamá Caro que ha sido la mujer que me enseñó a ser perseverante, a luchar por lo que soñamos, pero sobre todo de la que aprendí sobre el perdón, la comprensión. Recuerdo que en tu casa siempre había gente, eras tan cálida, tan linda, tan protectora y a la vez tan fuerte y decidida. Te disfruté tanto como pude. Yo quiero ser igual a ti. Si alguien me enseñó la pasión que una debe tener por lo que ama y disfruta, fuiste tú. A mi Tita y papá Macario por guiarme en el camino de la verdad, la honestidad y la solidaridad. Cada logro es de ustedes, abuelitos, ustedes lo hicieron posible. Los amo con todo lo que soy.

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. ABSTRACT

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO)

3.2 Fuentes principales de producción de ERO

3.2.1 Fuentes principales de formación de ERO por el espermatozoide

3.3 Sistema de defensa antioxidante

3.4 Enzimas antioxidantes

3.4.1 Superóxido dismutasa

3.4.2 Glutación peroxidasa

3.4.3 Catalasa

3.5 Participación de la actividad enzimática antioxidante en la fisiología espermática

3.6 ERO en la capacitación espermática

3.7 Almacenamiento espermático en el aparato reproductor femenino de *Corynorhinus mexicanus*

4. ANTECEDENTES

4.1 Sistema antioxidante en *Corynorhinus mexicanus*

5. JUSTIFICACIÓN

6. HIPÓTESIS

7. OBJETIVOS

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Sitio de colecta

8.2 Obtención de espermatozoides y fluido genital

8.3 Concentración y viabilidad espermática

8.3.1 Viabilidad espermática

8.3.2 Concentración espermática

8.4 Determinación de ERO en espermatozoide

8.5 Determinación de la actividad enzimática

8.5.1 Superóxido dismutasa

8.5.2 Catalasa

8.5.3 Glutación peroxidasa

8.6 Análisis estadístico

9. RESULTADOS

9.1 Viabilidad y concentración espermática

9.2 Especies reactivas de oxígeno en espermatozoides

9.3 Superóxido dismutasa en fluido genital femenino

9.4 Glutación peroxidasa en fluido genital femenino

9.5 Catalasa en fluido genital femenino

10. DISCUSIÓN

11. CONCLUSIÓN

12. PERSPECTIVAS

13. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN

En quirópteros, existen diferentes estrategias reproductivas para asegurar el éxito de la progenie. En *Corynorhinus mexicanus*, un murciélago vespertiliónido endémico de México, las hembras almacenan espermatozoides en la región utero-tubárica de noviembre a enero, manteniéndolos viables hasta la fertilización. A este fenómeno se le denomina **almacenamiento prolongado de espermatozoides**. Sin embargo, una de las amenazas a los que se enfrentan los espermatozoides en los distintos ambientes luminales del tracto reproductor de la hembra, es el daño por radicales libres. Estas especies químicas, son átomos con electrones desapareados que buscan completar su par electrónico, capturando electrones y oxidando átomos de otras moléculas. El oxígeno tiene la facultad de generar metabolitos con esta característica denominados especies reactivas de oxígeno (ERO). Para evitar una sobreproducción de ERO, las células cuentan con un sistema de defensa antioxidante enzimático que regula la presencia de las ERO; este sistema está constituido por la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR). Estas enzimas protegen a los espermatozoides evitando que las ERO generen daños en diferentes biomoléculas, comprometiendo la viabilidad de los gametos. Es por lo anterior que, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad enzimática antioxidante durante el almacenamiento de espermatozoides en el tracto genital de las hembras de *C. mexicanus*. Se capturaron 8 hembras de octubre (control negativo) a diciembre (almacenamiento espermático). Se determinó la actividad específica de SOD, GPX y CAT en el fluido genital por espectrofotometría, en cada uno de los meses. La actividad de SOD fue de 20 USOD/mL/min, sin variaciones en cada uno de los meses. La actividad de GPX fue de 70 UGPX/mL/min en octubre; mientras que en noviembre y diciembre hay un incremento hacia 140 UGPX/ mL/min. La actividad de CAT fue de 2000 UK/mL/min en octubre, en noviembre incrementa a 16000 UK/mL/min y en diciembre a 32000 UK/mL/min. También se evaluó la concentración de ERO en espermatozoides por citometría de flujo, sin encontrar diferencias significativas en ninguno de los meses de estudio. Los datos muestran que el sistema

de defensa antioxidante desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la viabilidad espermática en el tracto reproductor de las hembras de *C. mexicanus* durante el almacenamiento prolongado, a través de la regulación REDOX (ERO/antioxidantes); la SOD sin cambios significativos en su actividad para la dismutación constante de O_2^- y a su vez la formación de H_2O_2 , que será eliminado por GPX y CAT

2. ABSTRACT

In chiroptera, there are different reproductive strategies to ensure the success of the progeny. In *Corynorhinus mexicanus*, an endemic vespertilionid bat from Mexico, females store sperm in the utero-tubal junction from November to January, keeping them viable until fertilization. This phenomenon is called prolonged sperm storage. However, one of the threats sperm face in the different luminal environments of the female reproductive tract is by free radical damage. These chemical species are atoms with unpaired electrons that seek to complete their electronic pair, capturing electrons and oxidizing atoms of other molecules. Oxygen has the ability to generate metabolites with this characteristic called reactive oxygen species (ROS). To avoid an overproduction of ROS, cells have an enzymatic antioxidant defense system that regulates the presence of ROS. This system is made up of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR). These enzymes protect the sperm by preventing ROS from damaging different biomolecules, compromising the viability of the gametes. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the antioxidant enzymatic activity during sperm storage in the genital tract of *C. mexicanus* females. 8 females were captured from October (negative control) to December (sperm storage). The specific activity of SOD, GPX and CAT in the genital fluid was determined by spectrophotometry, in each of the months. SOD activity was 20 USO/mL/min, without variations in each of the months. The GPX activity was 70 UGPX/mL/min in October; while in November and December there is an increase towards 140 UGPX/mL/min. CAT activity was 2000 UK/mL/min in October, in November it increased to 16000 UK/mL/min and in December to 32000 UK/mL/min. The ROS concentration in sperm was also evaluated

by flow cytometry, without finding significant differences in any of the study months. The data show that the antioxidant defense system plays a fundamental role in maintaining sperm viability in the reproductive tract of *C. mexicanus* females during prolonged sperm storage, through REDOX regulation (ROS/antioxidants); the SOD without significant changes in its activity for the constant dismutation of O_2^- and in turn the formation of H_2O_2 that will be eliminated by GPX and CAT.

3. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen la capacidad de capturar electrones de otros átomos o moléculas, oxidándolas. El oxígeno diatómico (O_2), una molécula fundamental en el metabolismo aerobio puede producir metabolitos con estas características y pueden comprometer la viabilidad de las células somáticas y sexuales cuando no se regula su concentración (Arenas-Ríos, 2009). Estas moléculas son denominadas ERO. Por lo anterior, las ERO han sido objeto de estudio sobre los efectos que causan en los espermatozoides, dado que estos daños promueven la pérdida de la capacidad fertilizante. Para evitarlo, los gametos masculinos cuentan con un sistema de defensa antioxidante que se divide en enzimático (primario) y no enzimático (secundario) que contrarresta el efecto de los radicales libres, evitando el estrés oxidante, estado en el que la concentración de ERO sobrepasa a estos agentes reductores (Arenas-Ríos, 2009).

El sistema primario está conformado por la participación de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR), que mantienen un balance de las ERO ya que también participan en el caso particular de los espermatozoides, en procesos como la maduración y capacitación. Si el estado REDOX del ambiente luminal en el que se encuentran los gametos masculinos se ve alterado, podría verse comprometida la viabilidad celular. Por esta razón, los espermatozoides sobreviven por periodos cortos de tiempo. En la mayoría de los mamíferos, y dependiendo de la especie, una vez que ingresan los gametos masculinos al aparato reproductor femenino la estancia es de algunos días (León-Galván *et al.*, 1999; Crichton & Krutzsch, 2000).

Sin embargo, existen animales que almacenan los gametos viables por periodos más largos, varias semanas e incluso meses, como es el caso de muchas especies de vertebrados anfibios, reptiles y algunos mamíferos. A este último proceso se le denomina almacenamiento prolongado de espermatozoides (Racey, 1979; Crichton & Krutzsch, 2000).

El almacenamiento de espermatozoides por periodos extensos de tiempo es una estrategia que algunos vertebrados han desarrollado como adaptación a las diferentes presiones de selección. En mamíferos, esta característica se reduce casi por completo a murciélagos vespertiliónidos y está presente en aquellos quirópteros de zonas templadas, aunque también se puede presentar en algunas especies de zonas tropicales (Racey, 1982; Krishna, 1999; Crichton, 2000). En estas especies, existe un desfase entre los eventos gametogénicos masculino y femenino, por lo que, cuando se establece el periodo de apareamiento y se llevan a cabo las cópulas, las hembras son inseminadas, pero los ovocitos no son liberados a los oviductos, y los espermatozoides tienen que permanecer en el tracto reproductor femenino por periodos prolongados de tiempo (Racey, 1979).

La unión útero-tubárica es el sitio universal de almacenamiento de los espermatozoides, en algunas especies de murciélagos vespertiliónidos (Krishna & Bhatnagar, 2011). En *Corynorhinus mexicanus*, un murciélago vespertiliónido que se distribuye en zonas templadas de México, con un patrón reproductivo monoéstrico estacional (León-Galván, 1999; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2010) esto también ocurre así. Las hembras almacenan los espermatozoides por tres meses (noviembre, diciembre y enero) como estrategia para que la gestación inicie a finales de enero y las crías se desarrollen cuando la temperatura ambiental incrementa y la disponibilidad de alimento es mayor. Por tal motivo, es relevante estudiar si las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPX) son parte del mecanismo de protección espermático durante el periodo prolongado de almacenamiento de los gametos masculinos (noviembre-enero) en el tracto genital de las hembras de *Corynorhinus mexicanus*, proceso inusual en la mayoría de los mamíferos.

3.1 Radicales libres y Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Toda materia se compone de unidades pequeñas denominadas átomos, que a su vez, están compuestos de partículas subatómicas con cargas específicas: los protones, neutrones y electrones. Estos últimos giran en torno al núcleo a manera de orbitales (Arenas-Ríos, 2009, 2004; Konigsberg Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008). Es importante destacar que una partícula subatómica de carga negativa, únicamente puede estar asociado con otro electrón en el mismo orbital, es decir, sólo pueden haber dos en cada uno, los cuales tienen como característica, para interactuar, giros contrarios (*spin*) para anular recíprocamente su campo magnético (Arenas-Ríos, 2009, 2004). Sin embargo, esto no siempre es así, cuando en un orbital existe sólo un electrón, o tienen un *spin* en el mismo sentido, este átomo o especie química recibe el nombre de radical libre (Arenas-Ríos, 2004, 2009).

Los radicales libres suelen ser muy inestables, ya que el (los) electrón(es) desapareado(s), tienden con avidez en completar su par electrónico a partir de “capturar” electrones de otros átomos o moléculas y así dar lugar a la formación de nuevos radicales libres (Corrales & Muñoz-Ariza, 2012; Konigsberg-Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008). Estas reacciones son muy rápidas, pueden ocurrir en nanosegundos, ya que esta “búsqueda” por anular su campo magnético, favorece la colisión y aproximación a otros átomos o moléculas. Por otro lado, los radicales libres pueden asociarse entre ellos, provocando que ambos anulen sus campos magnéticos y dejen de ser inestables (Arenas-Ríos, 2009; Konigsberg-Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008).

El oxígeno molecular (O_2), una molécula fundamental para el metabolismo aerobio, tiene la característica de ser un “birradical libre”, ya que posee dos electrones desapareados de *spin* paralelo (Cota-Magaña, 2014). Sin embargo, las reacciones que involucran al oxígeno son regularmente univalentes, lo que significa que sólo aceptan un electrón a la vez. Cuando el O_2 acepta un e^- , el resultado de esa reacción es un radical libre llamado anión superóxido (O_2^-); molécula que a su vez genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a la asociación con dos H^+ ; que por su parte también

genera el ion hidroxilo (OH^\cdot) a través de reacciones con metales de transición como el Fe^{+2} . En conjunto, estas formas oxidantes de oxígeno se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO) (Figura 1) (Arenas-Ríos, 2009).

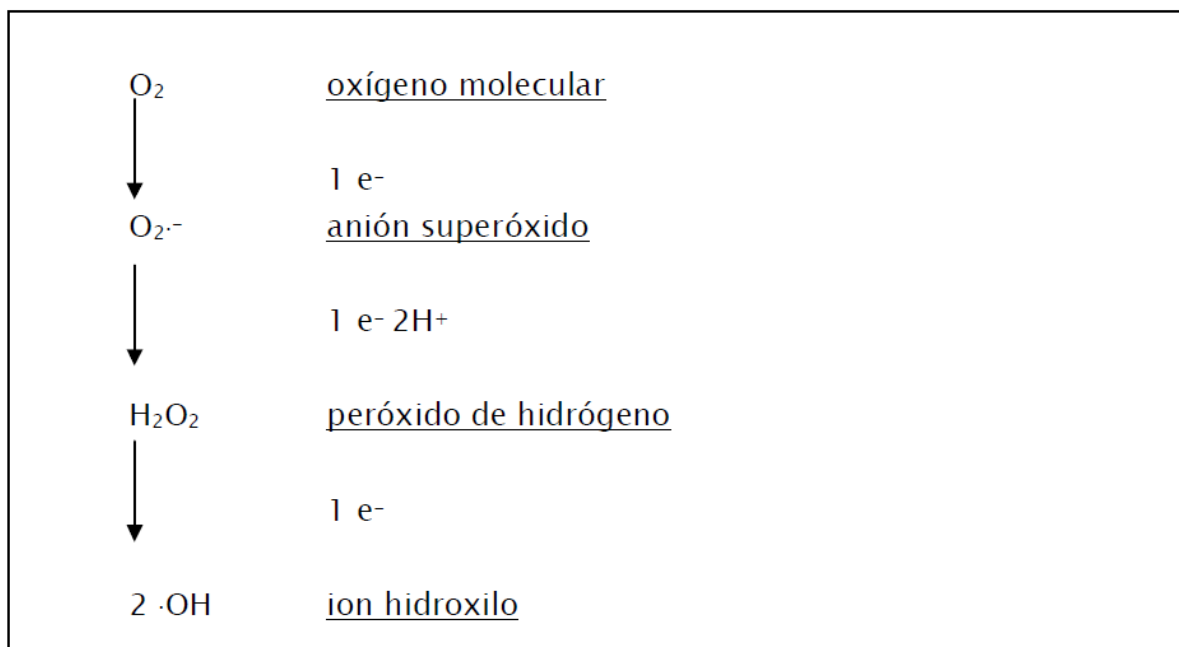


Figura 1. Esquema representativo de la formación de ERO. Tomado de Arenas-Ríos, 2009.

El tiempo de vida de las ERO es muy corto, por su capacidad oxidante capturan electrones de biomoléculas (ácidos grasos de las membranas; grupos Tiol en los residuos de cisteína de las proteínas, nucleótidos en el ADN, carbohidratos) con mucha rapidez, de hasta nanosegundos (Tabla 2).

Tiempo de vida de las ERO				
Sustancia	Símbolo	Tiempo de vida en seg. a 37°C	Potencial de reducción estándar (V)	
Oxígeno	O ₂	>10 ²	-0.46	(-)oxidante
Peróxido de Hidrógeno	H ₂ O ₂	-----	0.32	↓ (+)oxidante
Superóxido	O ₂ ⁻	1 X 10 ⁻⁶	0.94	
Hidroxilo	·OH	1 X 10 ⁻⁹	2.31	

Tabla 2. Tiempo de vida de las ERO. Tomado de Arenas-Ríos, 2009.

3.2 Fuentes principales de producción de ERO

Las ERO pueden ser producidas como parte del metabolismo celular; un ejemplo es la cadena respiratoria mitocondrial, que contiene varios centros REDOX en diferentes complejos que captan electrones, constituyéndose así una de las principales fuentes de ERO (Arenas-Ríos, 2009). Las ERO producidas en la mitocondria son parte fundamental del proceso del metabolismo del O₂ hacia su reducción a H₂O, sin embargo la sobreproducción de ERO se debe a un incremento en la actividad metabólica, a causa de distintos factores como el incremento de la temperatura, actividad física, etc., lo que provoca que en los centros REDOX de los complejos de la cadena respiratoria haya fuga de e⁻ y coadyuva la oxidación en biomoléculas y

daño celular como el estrés oxidante, que compromete la viabilidad de las células ocasionando su muerte (Arenas-Ríos, 2009).

Cabe resaltar que algunas células tienen otros mecanismos para producir ERO con propósitos fisiológicos, como los leucocitos y fagocitos, que contienen un tipo de enzima membranal llamada NADPH oxidasa, misma que produce $O_2^{\cdot-}$ en vesículas fagocíticas (Arenas-Ríos, 2009; Babior *et al.*, 1999).

3.2.1 Fuentes principales de formación de ERO por el espermatozoide

Igual que en las células somáticas, la mitocondria es el sitio principal generador de ERO en los espermatozoides. Puntualmente, la función del oxígeno es recibir los electrones provenientes de la cadena respiratoria, y junto con protones de la matriz mitocondrial, forman agua metabólica como un subproducto de la oxidación de la glucosa (Corrales & Muñoz Ariza, 2012; Konigsberg-Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008). A través de éstas moléculas transportadoras de electrones dispuestas en complejos enzimáticos multiprotéicos, los e^- donados por el NADH y FADH provenientes del ciclo de los ácidos carboxílicos pasan por los centros REDOX y cuando hay una sobre saturación de e^- es común que estas partículas subatómicas se fuguen asociándose con oxígeno molecular y generando radicales libres como el $O_2^{\cdot-}$ (Arenas-Ríos, 2009; Corrales & Muñoz-Ariza, 2012; Konigsberg-Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008).

Otra fuente generadora de ERO en espermatozoides es, la enzima NADPH oxidasa o NOX, que se encuentra en su membrana plasmática. La NOX recibe un electrón de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), que se encuentra en la superficie citosólica de la membrana, y dona este e^- al oxígeno molecular extracelular que entra por difusión generando anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Éste a su vez, puede convertirse más tarde en H_2O_2 , principalmente por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que se explica más tarde. Lo anterior, ha sido corroborado en estudios donde se ha reportado que los espermatozoides de toro, verraco y carnero son capaces de producir H_2O_2 por acción de la NADPH oxidasa

(Tosic & Walton, 1950), como también se ha reportado en espermatozoides de conejo (Holland *et al.*, 1982; Álvarez & Storey, 1984; Bass *et al.*, 1983). Así mismo, en otras investigaciones se ha confirmado que la fuente principal de producción de ERO por espermatozoides se debe al exceso de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, enzima crucial en la vía de las pentosas fosfato, que permite la producción de elevadas cantidades de NADPH, por acción de NADPH oxidasa presente en la membrana de los espermatozoides, se promueve la producción de O_2^- (Arenas-Ríos *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 1992; Aitken *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 1996; Segal & Abo, 1993).

También se ha observado que el residuo citoplasmático de los espermatozoides, remanente que permanece después de que éstos son liberados a la luz de los túbulos seminíferos, garantiza la producción de ERO por la vía de las pentosas; de tal manera que, entre mayor sea la concentración de espermatozoides con citoplasma residual se produce un exceso de NADPH oxidasa, lo que a su vez promueve el incremento de ERO como el H_2O_2 . Posteriormente, si los espermatozoides epididimarios no son madurados completamente, y son eyaculados e ingresan al aparato reproductor femenino con gota citoplásmica, esto significaría que aquellos que la posean morirían por autotoxicidad a causa de la producción de ERO, y sólo aquellos que estén libres de gota citoplásmica serán almacenados. Lo anterior no es solamente el resultado de la actividad de la NADPH oxidasa, sino que también depende en gran medida de toda la actividad mitocondrial (Aitken *et al.*, 1992; Aitken *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 1996).

Es importante resaltar que cuando existe un equilibrio REDOX, mediada por el sistema de defensa antioxidante, las ERO también participan de forma “positiva” en la fisiología espermática, es decir que son fundamentales dentro de las vías de señalización para que el espermatozoide se capacite en el tracto reproductor femenino y éste adquiera su capacidad fertilizante. Esto se describirá a detalle a partir del apartado 3.5.

3.3 Sistema de defensa antioxidante

Las ERO son protagonistas de numerosas enfermedades relacionadas a la infertilidad (Corrales & Muñoz-Ariza, 2012) ya que si no son reguladas pueden promover la muerte de los espermatozoides. Sin embargo, las ERO son reguladas por agentes reductores denominados “sistema de defensa antioxidante”, encargados de mediar su producción y evitar daño o incluso la muerte de la célula. Este sistema anti-ERO, se divide en dos grupos principalmente: a) enzimático, constituido por las enzimas SOD, CAT, GPX y GR; b) no enzimático, a cargo de vitaminas (A, C, E), glutatión, melatonina, las ubiquinonas, los carotenoides, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, entre otros (Konigsberg-Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008). El sistema de defensa antioxidante constituido por las enzimas SOD, CAT y GPX tienen como objetivo mantener el equilibrio REDOX, pero si este sistema se ve superado por la producción de ERO, que incide en la integridad celular, se provocan procesos tóxicos a partir de “secuestrar” electrones de ácidos grasos, proteínas, carbohidratos y pueden llegar a provocar daño al ADN (Corrales & Muñoz-Ariza, 2012).

3.4 Enzimas antioxidantes

3.4.1 Superóxido dismutasa

Las isoformas de SOD, son una familia de enzimas que catalizan la dismutación de O_2^- . En los mamíferos, se reconocen tres iso-enzimas de esta familia: dos intracelulares como la SOD1 que se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas y la membrana externa mitocondrial. Su centro catalítico está formado por un cobre y un zinc (SOD Cu-Zn). La SOD2 se encuentra al interior de la mitocondria (organelo que está sometido mayormente a estrés oxidante) y tiene un centro catalítico de Mn. La SOD3, enzima de la matriz extracelular unida principalmente a heparina y a las fibras de colágena tipo 1 de la mayoría de los tejidos; además se ha encontrado en plasma, fluido linfático y líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, su concentración es 20 veces mayor en la matriz extracelular que en el plasma (Gómez-Quiroz & Cuevas, 2008).

La reacción enzimática de la SOD se lleva a cabo en dos pasos; primero, el O_2^- llega al centro de reacción y se une a una arginina; el O_2^- al donar su electrón es transferido al Cu^{2+} , que se transforma en Cu^+ . Lo anterior provoca que el enlace entre la histidina de la SOD y el Cu^+ se rompa y se protona al nitrógeno de la histidina. El O_2 formado se disocia de la arginina y se libera. La segunda parte de la reacción comienza de manera similar a la primera; el O_2^- al llegar al centro catalítico de la enzima se une a una arginina; cerca del centro catalítico, se protona una molécula de agua (H_3O^+). El electrón que recibió el Cu es transferido al O_2^- lo cual oxida al metal a su forma Cu^{2+} . Los dos electrones que posee el superóxido, forman inmediatamente dos enlaces covalentes con dos protones donados, uno por la molécula de agua y otro del nitrógeno de la histidina, con lo cual se libera H_2O_2 y la enzima se regenera (Figura 3) (Gómez Quiroz & Cuevas 2008).

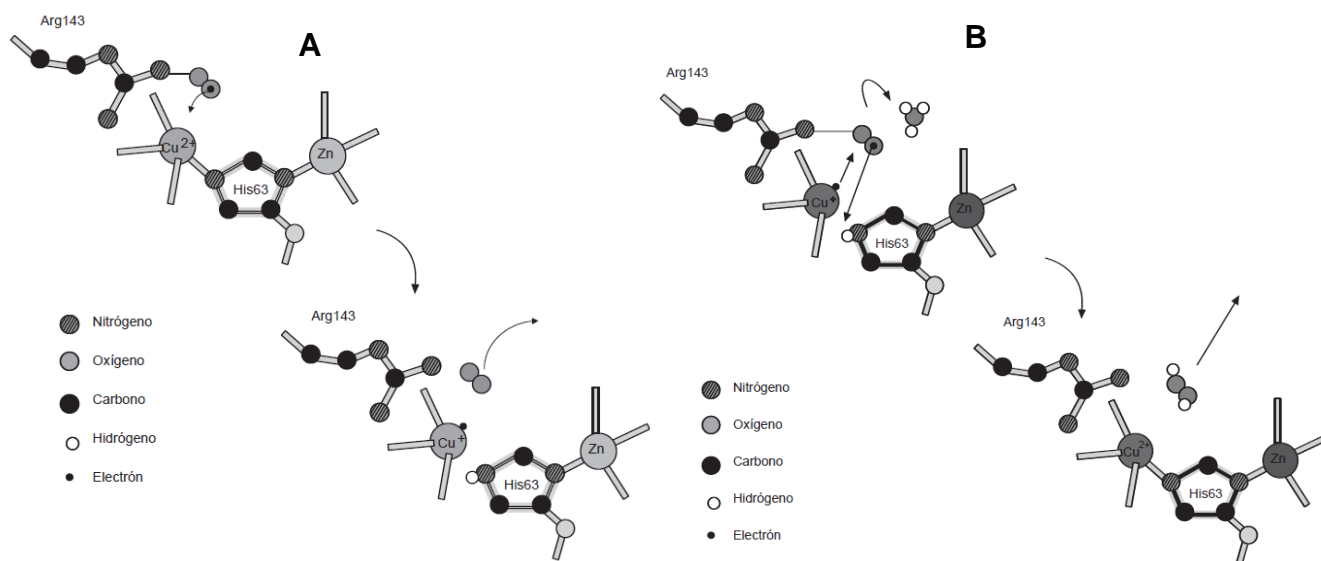


Figura 3. Mecanismo de reacción de SOD. A) Eliminación del primero O_2^- y reducción del Cu. B) Transformación del segundo O_2^- a H_2O_2 y regeneración del centro catalítico. Tomado de Konigsberg Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008.

3.4.2 Glutatión peroxidasa

La GPX es la responsable de eliminar H_2O_2 . Esta descomposición ocurre mediante oxido-reducción que ocupa una molécula específica como agente reductor. La GPX

requiere al glutati3n reducido (GSH) como agente reductor. El centro catal3tico de esta enzima est3 constituido de selenio (Se). Se conocen cuatro enzimas, en los tejidos de los mam3feros, dependientes de Selenio: GPX citos3lica (GPX1), GPX gastrointestinal (GPX2), GPX plasm3tica (GPX3) y GPX de fosfol3pidos (GPX4) (Cota-Magaña, 2014).

La capacidad reductora de las enzimas GPX se basa en altas concentraciones de glutati3n reducido (GSH); un trip3ptido celular con un grupo sulfhidrilo, con capacidad antioxidante. Durante el mecanismo catal3tico de GPX, un Se reacciona con un per3xido para producir 3cido sel3nico, aqu3 es donde se une el primer GSH formando agua y una prote3na Se-SG. Posteriormente, se enlaza un segundo GSH produciendo una prote3na Se-GH m3s un H⁺ y un GSSG (Cota-Magaña, 2014).

3.4.3 Catalasa

La CAT es una enzima que se encuentra primordialmente en los peroxisomas, aunque tambi3n se encuentra en la mitocondria. Protege a la c3lula de la acumulaci3n de H₂O₂, degrad3ndolo hasta convertirlo en agua. Para esto, la CAT emplea una segunda mol3cula de H₂O₂ como agente reductor, por lo que no necesita de ning3n otro sustrato; a esto se le conoce como reacci3n catal3tica (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado, 2008). La CAT tambi3n tiene una funci3n peroxidativa que utiliza como donadores de hidr3geno al metanol, etanol, 3cido f3rmico, fenol, y formaldehido (Cota-Magaña, 2014).

Debido a la afinidad de las catalasas por su sustrato, se sabe que estas enzimas act3an a altas concentraciones del H₂O₂. Por el contrario, las enzimas que tienen una afinidad mayor por las ERO, como las peroxidasas y las peroxirredoxinas, act3an ante el H₂O₂ en bajas concentraciones (Corrales & Muñoz Ariza, 2012; Konigsberg Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008).

3.5 Participaci3n de la actividad enzim3tica antioxidante en la fisiolog3a esperm3tica

Se ha propuesto que la lipoperoxidación (LPX), oxidación en ácidos grasos insaturados de las membranas por acción de las ERO, podría estar provocando pérdida de movilidad en espermatozoides, efecto principalmente debido al contenido de malondialdehído (MDA) (Arenas-Ríos, 2009). A su vez, las ERO puede dañar proteínas, entre las que se encuentran las enzimas lactato deshidrogenasa, piruvato cinasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y ATPasa, lo cual también genera la pérdida en la movilidad del espermatozoide y la muerte celular (Arenas-Ríos, 2009). Sin embargo, ya se ha reportado que existe una relación entre la actividad enzimática de SOD, GPX y CAT con la movilidad espermática. Estas enzimas evitan que la sobreproducción de ERO tenga efectos negativos en los gametos masculinos como la pérdida de la movilidad progresiva dentro del aparato reproductor femenino, y así que puedan llegar hasta la región oviductal.

3.6 ERO en la capacitación espermática

Las ERO son fundamentales para que el espermatozoide se capacite y adquiera su capacidad fertilizante, resaltando que en los murciélagos que muestran almacenamiento prolongado de espermatozoide existe un retraso en este evento de maduración en el tracto genital femenino (Krishna y Bhatnagar, 2011). La capacitación en mamíferos está regulada, entre otros factores, por reacciones de óxido-reducción. El grupo de De Lamirande, realizó una investigación en 1997 relacionado a la capacitación espermática y la participación de las ERO. Concluyeron que el H_2O_2 y el O_2^- tienen un papel fundamental en la regulación positiva en los niveles de AMPc a través de la oxidación de la adenilato ciclasa a nivel de los grupos Tiol de la cisteína que contiene. Ésto a su vez ya ha sido reportado en otros trabajos (Chen et al., 2013; Riley y Behrman, 1991).

Por otra parte, se ha visto que las ERO participan en la inhibición de la tirosina fosfatasa, que indirectamente promueve que haya un aumento en los niveles de fosforilación de tirosinas que acompañan las señales de transducción en la capacitación. Esta supresión ocurre a través los residuos de cisteína que posee, ya que para que la enzima se encuentre activa, requiere encontrarse en un estado

reducido (Gu y Hecht, 1996; Haffetz et al., 1990; Takakura et al., 1999). A su vez, las ERO también participan en un mecanismo activador. La adenilato ciclasa es oxidada por el O_2^- , en los grupos Tiol de los residuos de cisteína. Esta activación incrementa los niveles de AMPc en la célula que promueve que se lleve a cabo la actividad de la tirosina cinasa (Zhang y Zheng, 1996; Baker et al., 2004, 2005; Ickowicz et al., 2012) creando una cascada autorregulada que involucra la generación de las ERO, la adenilato ciclasa y activación de fosforilación de tirosinas para que, finalmente, el espermatozoide se capacite (Aitken et al., 1995; Rivlin et al., 2004; Roy y Atreja, 2008;) y ocurra la reacción del acrosoma (O'Flaherty et al., 1999).

Finalmente, se ha propuesto que las ERO también participan en los procesos necesarios de óxido-reducción (REDOX) en la quimiotaxis de gametos y la fusión de los mismos (Kothari et al., 2010; Chen et al., 2013).

Al evaluar la relación entre calidad seminal, estrés oxidante (integridad del ADN y LPX) y la actividad de las enzimas antioxidantes, se ha demostrado que la concentración espermática, la movilidad progresiva y el porcentaje de morfología normal, correlacionan positivamente con la actividad de las enzimas SOD y CAT y negativamente la LPX (Arenas-Ríos, 2009).

3.7 Almacenamiento espermático en el aparato reproductor femenino de *Corynorhinus mexicanus*

Como ya se mencionó, en algunos murciélagos como *C. mexicanus* los eventos gametogénicos masculinos y femeninos se desfasan temporalmente, lo que quiere decir que cuando las hembras son inseminadas, aún no hay ovulación y los espermatozoides permanecen en el tracto reproductor femenino por periodos prolongados de tiempo, ya que la fertilización es postergada (López-Wilchis, 1989). Este almacenamiento ocurre en la unión útero-tubárica y se ha reportado como el sitio universal de almacenamiento del espermatozoide en la mayoría de los murciélagos vespertilionidos (Krishna & Bhatnagar, 2011). Una vez que los espermatozoides llegan a la región útero-tubárica, estas células orientan sus cabezas

hacia el epitelio ciliado, el cual abunda en el aparato genital de las hembras, lo que sugiere que este tejido participa integralmente en el almacenamiento de las células (Racey, 1979; Uchida & Mori, 1988) proporcionando “nutrientes” para su supervivencia (Krishna, 1999). Una investigación realizada por Roy y Krishna en 2010, proporcionó evidencia del almacenamiento prolongado de espermatozoides en las hembras de *Scotophilus heathii*. En este murciélago, los espermatozoides se almacenan entre enero y marzo en la unión útero-tubárica con las cabezas ancladas íntimamente al epitelio ciliado (Rodríguez-Martínez, 2007). Además de este aporte, Crichton y colaboradores en 2000 propusieron que el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides también está mediada por algún mecanismo supresor metabólico y podría ser hormonal (Racey, 1982; Crichton, 2000; Roy & Krishna, 2011). También se ha observado un incremento en la actividad específica de las enzimas anti-ERO en el epidídimo de *C. mexicanus* durante el almacenamiento prolongado (Arenas-Ríos *et al.*, 2016). Una vez que los espermatozoides ingresan al aparato reproductor femenino, debe haber condiciones REDOX adecuadas y reguladas para promover la capacitación, evento fundamental para que los gametos masculinos adquieran su capacidad fértil. El presente trabajo realizó la evaluación entre el sistema de defensa antioxidante enzimático en el fluido genital de las hembras y la concentración de ERO en espermatozoides de *C. mexicanus*.

4. ANTECEDENTES

El murciélago orejón *Corynorhinus mexicanus*, endémico de México, es un vespertiliónido de zonas templadas que presenta un patrón reproductivo de tipo asincrónico. Es decir, que los procesos de espermatogénesis se desfasan con la ovogénesis; ocurriendo la formación de gametos masculinos durante los meses de mayo a septiembre y la foliculogénesis durante los meses de agosto a octubre (López-Wilchis, 1989). A pesar de que las cópulas se llevan a cabo en los meses de noviembre y diciembre, la ovulación ocurre hasta finales de enero, propiciando que los espermatozoides sean almacenados en el tracto reproductor femenino hasta por 3 meses (López-Wilchis, 1989). En comparación con el humano, se tiene registro que

los espermatozoides pueden estar almacenados en el tracto genital de las mujeres máximo 48 horas (Tortora & Derrickson, 2013).

4.1 Sistema antioxidante en *Corynorhinus mexicanus*

Tratando de comprender que es lo que permite a los espermatozoides permanecer viables por tanto tiempo, León-Galván y colaboradores en 1999 obtuvieron espermatozoides del tracto genital de las hembras de *C. mexicanus*, encontrando un 65-75% de células viables, pero con baja movilidad. Al agregar fluido genital de las hembras de *C. mexicanus* a espermatozoides de esta especie y de cerdo, observaron una inhibición de la LPX en presencia del fluido genital (León-Galván *et al.*, 1999; 2005).

Se sabe que la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPX y CAT están presentes en la región cefálica y caudal del epidídimo de *C. mexicanus*, pudiendo ser importantes en la modulación de las ERO en los procesos de maduración y almacenamiento de espermatozoides (Arenas-Ríos *et al.*, 2004) y evitar la LPX de los espermatozoides en esta especie (Arenas-ríos *et al.*, 2016; Cervantes *et al.*, 2008). De manera similar, se sabe que hay mecanismos reguladores de las ERO en el tracto genital femenino en otros mamíferos, ya que el O_2^- y H_2O_2 en niveles óptimos contribuyen a la capacitación del espermatozoide durante su trayecto en el tracto reproductor femenino, así como participar en la fertilización del ovocito (Bhatt *et al.*, 2004; Ross & Pawlina 2011).

De acuerdo a lo reportado por Vandaele y colaboradores en 2010, la exposición de ovocitos a H_2O_2 durante la maduración, por un período corto de tiempo, mejoró el desarrollo de embriones de bovinos. Por otra parte, esta misma exposición a niveles más altos de ERO causó daño a los espermatozoides, ovocitos, embriones y células epiteliales del oviducto (Kopper *et al.*, 2008; Vandaele *et al.*, 2010). Esto apoya la idea de la participación de un mecanismo antioxidante en el oviducto con una serie de antioxidantes que incluyen SOD, GPX y CAT, y en efecto se ha reportado que, tanto en células secretoras y ciliadas en la mucosa oviductal bovina hay actividad

enzimática de SOD, GPX y CAT, siendo mayor la actividad de GPX en células ciliadas.

Lapointe y colaboradores (1998; 2003), mencionan que las células epiteliales secretoras y ciliadas son las fuentes más importantes de antioxidantes enzimáticos presentes en el fluido luminal del oviducto. Las células epiteliales son responsables de la preservación del microambiente de la luz del aparato reproductor femenino y de la preparación del oviducto para la fertilización del ovocito y supervivencia del embrión en desarrollo antes de su transporte al útero (McNutt-Scott & Harris, 1998).

Por lo antes descrito, se sugiere que las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX pueden tener un papel fundamental en la sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino del murciélago *C. mexicanus* durante el largo periodo de almacenamiento de espermatozoides, no sólo como sistema protector para las células, si no como mediador en la regulación de la producción de las ERO fundamentales para procesos como la capacitación espermática y eventos posteriores para que la singamia se lleve a cabo de forma exitosa.

5. JUSTIFICACIÓN

En el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, las hembras almacenan espermatozoides en el tracto reproductor hasta por tres meses. Esta característica reproductiva, en el presente modelo de estudio, permite estudiar la participación del sistema enzimático de defensa antioxidante conformado por SOD, CAT y GPX; como mecanismo de protección y modulador de la concentración de las ERO en el espermatozoide.

El conocimiento de la actividad enzimática anti-ERO durante el almacenamiento prolongado de espermatozoides en el útero de *C. mexicanus* podría servir de precedente en la comprensión de los procesos y/o mecanismos que favorecen la viabilidad de los gametos masculinos por periodos prolongados de tiempo de manera natural, y que a su vez, permitirá la generación de protocolos de técnicas de reproducción asistida, aplicadas a la conservación de gametos de diferentes

especies, en un medio similar al del tracto genital de las hembras de esta especie de quiróptero.

6. HIPÓTESIS

Dado que la alta concentración de las ERO pueden provocar la muerte de las células, si las hembras de *C. mexicanus* almacenan espermatozoides en su tracto reproductor por periodos prolongados, habrá un aumento en la actividad enzimática de SOD, GPX y CAT en su fluido genital que evitarían la muerte de espermatozoides.

7. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, aumentan en el fluido genital femenino durante el proceso de almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago *C. mexicanus*.

Objetivos particulares

Determinar la actividad específica de SOD, CAT y GPX en el fluido genital femenino de *C. mexicanus*

Determinar la concentración de ERO en los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino durante el periodo prolongado de almacenamiento espermático en el murciélago *C. mexicanus*.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Sitio de colecta

La captura de ejemplares se realizó en un túnel, que es ocupado como refugio por murciélagos y que se localiza en el estado de Tlaxcala a 10 km del este de Tlaxco, Tlaxcala, a 3220 m 19° 37'14" N y 98°02'02" W (López-Wilchis, 1989). Los ejemplares utilizados en el presente estudio, estuvieron bajo 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.

8.2 Obtención de espermatozoides y fluido genital

Se capturaron 3 hembras mensualmente de octubre a enero; octubre para comparar la actividad enzimática antioxidante del fluido genital femenino sin espermatozoides, con respecto a los meses de almacenamiento espermático (noviembre y diciembre). Se ingresó al refugio durante el día y se obtuvieron a los ejemplares utilizando una de golpe (León Galván *et al.*, 2005; Kunz, 1988).

Los animales se trasladaron al laboratorio de “Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide” de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa y se sacrificaron por decapitación. Para la obtención del tracto genital femenino, se realizó una incisión ventral desde la región terminal del esternón hasta el hueso pélvico para tener acceso amplio al tracto reproductor. El fluido genital femenino se obtuvo haciendo un lavado en el tracto genital completo con 800 μ L de medio Ringer, utilizando una aguja hipodérmica No. 27 insertada a través de la apertura vaginal (León-Galván, 1999). El fluido recuperado se centrifugó durante 5 minutos a 500 \times g. El precipitado que contenía espermatozoides se resuspendió y se usó para determinar la presencia, el número y la viabilidad de los espermatozoides (León-Galván, 1999), así como para determinar ERO. El fluido genital de los meses que contenía espermatozoides se comparó con el fluido sin espermatozoides (Arenas-Ríos *et al.*, 2004; León-Galván, 1999; WHO, 2010; Cervantes *et al.*, 2008). Los sobrenadantes libres de espermatozoides obtenidos de las hembras capturadas durante octubre, noviembre y diciembre se utilizaron para estudiar la actividad enzimática antioxidante.

8.3 Concentración y viabilidad espermática

El análisis de espermatozoides obtenidos del aparato reproductor de las hembras de *C. mexicanus* se realizó considerando los parámetros de viabilidad y concentración

espermática, descritos en el Manual de la OMS para la Evaluación de Semen Humano y con base en el trabajo de León-Galván, 1999.

8.3.1 Viabilidad espermática

Para determinar la viabilidad se utilizó una solución de eosina-nigrosina. Se preparó una laminilla donde se colocó 5µL de semen y 5 µL de la solución de eosina-nigrosina, se mezcló y posteriormente se expandió en la superficie del portaobjetos (frotis), se secó a 36°C. Se observó la muestra al objetivo 40X en el microscopio de campo claro, y se realizó un conteo de 100 espermatozoides distinguiendo entre vivos y muertos. La eosina tiñe el citoplasma de los espermatozoides con membrana plasmática dañada, los cuales se les considera muertos, mientras que la nigrosina proporciona un fondo oscuro para la evaluación al microscopio. Aquellas células que se percibían hialinas se consideraron vivas. El número de espermatozoides vivos se consideró como el porcentaje de viabilidad (León-Galván, 1999).

8.3.2 Concentración espermática

Para calcular el número de espermatozoides obtenidos del aparato genital femenino de *C. mexicanus*, se hizo un conteo utilizando la cámara de Neubauer. Se realizó una dilución 1:20 de la muestra de espermatozoides con agua destilada y se colocaron 10µL de la dilución a cada lado de la cámara con ayuda de una micropipeta.

Los valores obtenidos en cada lado de la cámara se promediaron y se calculó la concentración dividiendo el promedio entre el factor de conversión, que en este caso fue 0.2. El resultado se expresa en millones de espermatozoides por mililitro (WHO 2010).

8.4 Determinación de ERO

El contenido de ERO en espermatozoides se determinó por citometría de flujo (citómetro FAX EXCALIBUR) usando ensayos con diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCF) a 32µM (Cathcart *et al.*, 1983; Bass *et al.*, 1983). Para incorporar el DCF los espermatozoides se incubaron 15 minutos en total oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron (500 X g, 5

minutos) con la finalidad de desechar el DCF que no se incorporó a las células. El botón espermático se resuspendió en 1 mL de Ringer, antes de cuantificar la intensidad de fluorescencia en el citómetro de flujo, usando una longitud de onda de excitación de 480 nm, y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Se determinó el índice de fluorescencia (IF)= (Intensidad de fluorescencia media) (%de eventos). Para el análisis de datos se usó el programa "FLOWING" (Arenas-Ríos, 2009).

8.5 Determinación de la actividad enzimática

8.5.1 Superóxido dismutasa

En la determinación de la actividad de SOD se empleó xantina y xantina oxidasa (XOD) para la formación de radicales superóxido, y su posterior reacción con cloruro de 2-(4-yodofenil) 3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T.), con lo que se forma el colorante formazán rojo. Finalmente el cromógeno formado se cuantificó espectrofotométricamente a 505 nm (espectrofotómetro VWR). La técnica de la determinación de SOD se basa en el hecho de registrar la disminución en la formación del cromógeno debido a la eliminación del superóxido por acción de SOD cuya fuente es el fluido genital (sobrenadante utilizado). El sistema de reacción consistió de 25 µL de sobrenadante, fuente de enzima, 850 µL de substrato mixto y 125 µL de XOD, agitando con vortex (5 minutos) después de adicionar cada uno de los reactivos, y su posterior cuantificación en el espectrofotómetro a 450 nm(Arenas-Ríos, 2009).

8.5.2 Catalasa

La determinación de la actividad de CAT se realizó en un sistema de reacción con KMnO_4 cuya coloración intensa se registró espectrofotométricamente. El fundamento de la técnica consiste en la disminución del color debido a la reacción de peroxidación provocada por H_2O_2 hacia el permanganato de potasio, y el mantenimiento del color en presencia de CAT. Para ello, la enzima se solubilizó y activó en el sobrenadante tratándola en frío con 1 µL de etanol (96%) y 5 minutos con tritón X-100 (1:5). Posteriormente a esto, las soluciones se diluyeron 1:5 con HEPES. Finalmente se leyó en espectrofotómetro a 480 nm (Arenas-Ríos, 2009).

8.5.3 Glutación peroxidasa

La actividad de GPX se determinó por el método de Mills, que se basa en la cuantificación espectrofotométrica del glutatión (GSH) a una longitud de onda de 340 nm. El GSH es uno de los componentes del sistema de reacción por medio del cual la GPX en conjunto con la glutatión reductasa (GPX/GR) modulan la acción del H₂O₂ convirtiéndolo en agua; por su parte, el GSH es oxidado al disulfuro GSSG (glutatión oxidado). El sistema de reacción requiere NADPH como donador de protones. El sistema de reacción consistió de 50 µL de sobrenadante, fuente de enzima, 355 µL de mezcla de reacción; 50 µL de NADPH y 50 µL de H₂O₂, este último se adicionó después de agitar en Vortex e incubar por 3 minutos a 25° C, por último se leyó a 340 nm (Arenas-Ríos, 2009).

8.6 Análisis estadístico

Para determinar la normalidad de los datos realizó una prueba de *Kolmogorov-Smirnov* y se hizo una prueba de *Levene* para determinar homocedasticidad de varianzas.

En el caso de los datos que cumplen con normalidad y homocedasticidad se realizaron pruebas paramétricas para comparar entre grupos (más de 2) ANOVA de una vía; en el caso de los datos con diferencias estadísticamente significativas se realizó una prueba post-hoc *Tukey-Kramer* para corroborar donde se encontraban las diferencias ($p < 0.05$), $n= 2$ (octubre); 3 (noviembre y diciembre). Para el caso de los datos no normales y con heterocedasticidad de las varianzas se hicieron pruebas no paramétricas para comparar entre grupos (*Kruskall-Wallis*), seguido de una prueba post-hoc de *Mann-Whitney pairwise* para corroborar donde se encontraban las diferencias con $p < 0.05$, $n= 3$ (octubre); 3 (noviembre y diciembre). Para comparar dos muestras independientes se realizó una prueba *t-Student* para datos normales y con homocedasticidad de varianzas. Los programas estadísticos utilizados fueron *R studio* y *Past*.

9. RESULTADOS

9.1 Viabilidad y concentración espermática

Se determinó la viabilidad y concentración de espermatozoides (Tabla 1), para verificar la cantidad de células y realizar los cálculos necesarios para la evaluación de especies reactivas de oxígeno en espermatozoides. La finalidad de incluir en el estudio hembras en el mes de octubre se debe a que se esperó encontrar fluido genital libre de espermatozoides como control, ya que es una etapa previa al apareamiento. El porcentaje de espermatozoides vivos durante los meses de almacenamiento (noviembre y diciembre), refleja diferencias significativas entre meses ($t= 2.86$, $p= 0.09$). La concentración celular (millones de espermatozoides/mL) es similar durante el almacenamiento, sin embargo, se observó una menor concentración espermática en diciembre ($t=0.98$, $p=0.38$).

Tabla 1. Evaluación de la viabilidad (porcentaje) y concentración espermática (millones/mL) de espermatozoides obtenidos del aparato reproductor femenino de *C. mexicanus*, durante los meses de almacenamiento espermático (noviembre y diciembre, 2019). Diferentes letras indican diferencias significativas a una $p<0.05$ (*t-Student*).

Meses de captura	% Viabilidad		10^6 espermatozoides/mL	
	n=	Media \pm eE	n=	Media \pm EE
Oct (Precópulas)	0	0	0	0
Nov (Almacenamiento espermático)	3	45 \pm 2.60 ^a	3	5.41 \pm 0.33
Dic (Almacenamiento espermático)	3	32.66 \pm 1.79 ^b	3	4.58 \pm 0.33

9.2 Especies reactivas de oxígeno en espermatozoides

Dado que la concentración de ERO fue determinada en espermatozoides, en la figura 3 se presentan los resultados de la concentración de ERO de espermatozoides obtenidos del aparato reproductor femenino de *C. mexicanus*, comparando octubre (precópulas) vs noviembre y diciembre (almacenamiento de espermatozoides). El

índice de fluorescencia, considerado como indicador de la concentración de ERO, entre meses no presenta diferencia significativa ($t=1.55$, $p=0.14$) aun cuando el valor fue mayor en el mes de diciembre.

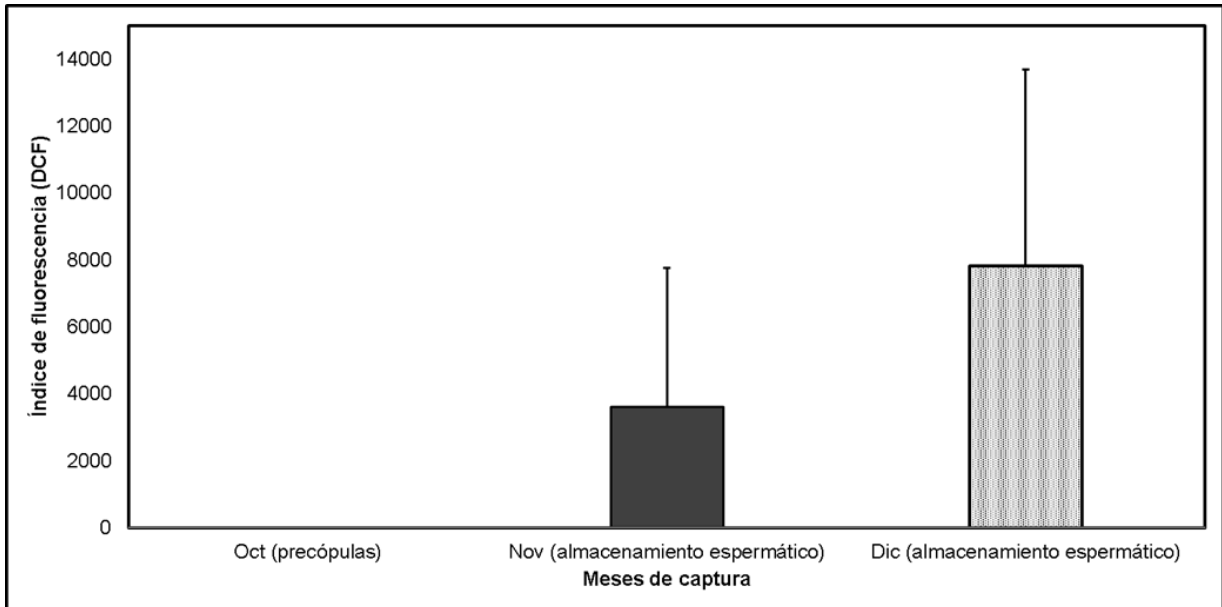


Figura 3 Determinación de ERO en espermatozoides obtenidos del aparato reproductor femenino de *C. mexicanus* capturadas en noviembre y diciembre de 2019. Las barras representan el promedio \pm EE, $n= 3$ hembras por mes o fecha de captura.

9.3 Superóxido dismutasa en fluido genital femenino

En la figura 4 se observa la actividad específica de SOD del fluido genital femenino de *C. mexicanus*, de octubre (precópuas), noviembre y diciembre (almacenamiento espermático). Si bien en octubre se registró una mayor actividad de SOD respecto a noviembre y diciembre, las diferencias de actividad enzimática entre los meses de estudio no fueron estadísticamente significativas ($F=2.48$, $p=0.12$).

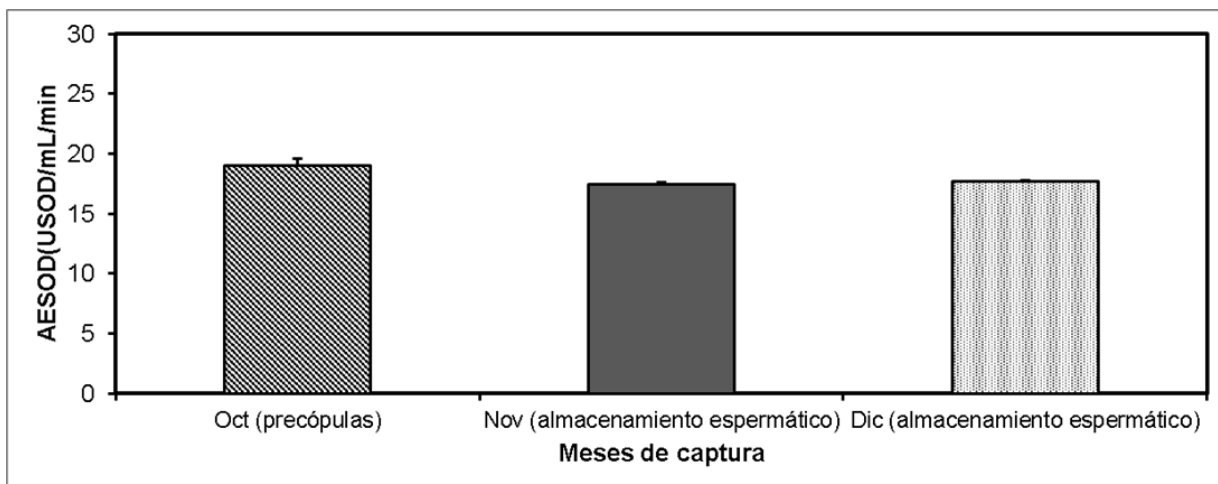


Figura 4 Determinación de la actividad específica de SOD (expresada como USOD [cantidad de la enzima que inhibe el 50% de formazán]), en el fluido genital femenino de *C. mexicanus*, capturadas de octubre a diciembre de 2019. Las barras representan los valores promedio \pm EE, $n=3$ hembras por mes.

9.4 Glutación peroxidasa en fluido genital femenino

La actividad específica de GPX (AEGPX) en el fluido genital femenino de *C. mexicanus* se muestra en la figura 5. La AEGPX en el mes en que todavía no inicia el periodo de apareamientos (octubre=precópuas), es significativamente menor ($F=4.51$, $p=0.03$) con respecto a los meses de almacenamiento espermático (noviembre y diciembre); con una tendencia a incrementar hacia el término del periodo de almacenamiento (diciembre).

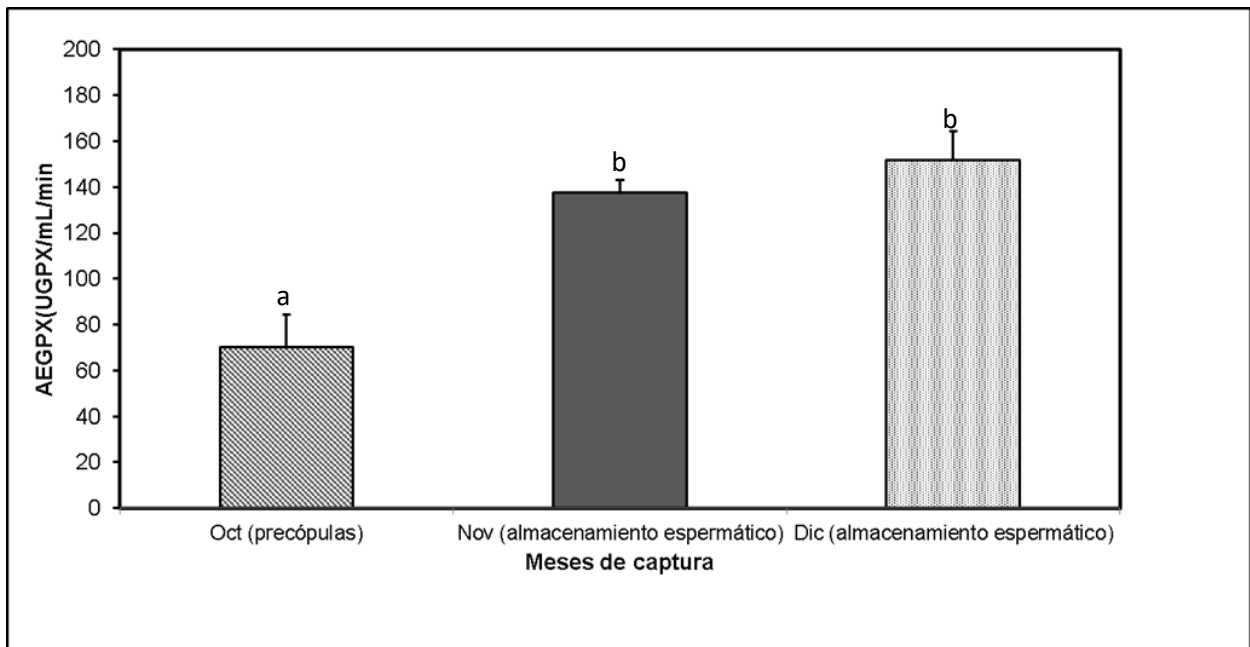


Figura 5 Determinación de la actividad específica de GPX (expresada como UGPX [nmol NADPH oxidado por minuto]), en fluido genital femenino de *C. mexicanus*, capturadas de octubre a diciembre de 2019. Las barras representan valores promedio \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las medias, $n=3$ hembras por mes.

9.5 Catalasa en el fluido genital femenino

En la figura 6 se muestra la actividad específica de CAT en el fluido genital de las hembras de *C. mexicanus*. Existe un aumento significativo de la actividad específica de CAT conforme transcurren los diferentes meses de estudio (octubre vs noviembre vs diciembre) ($F= 27.65$, $p=2.07E-05$); siendo significativamente mayor la actividad de CAT en el mes de diciembre.

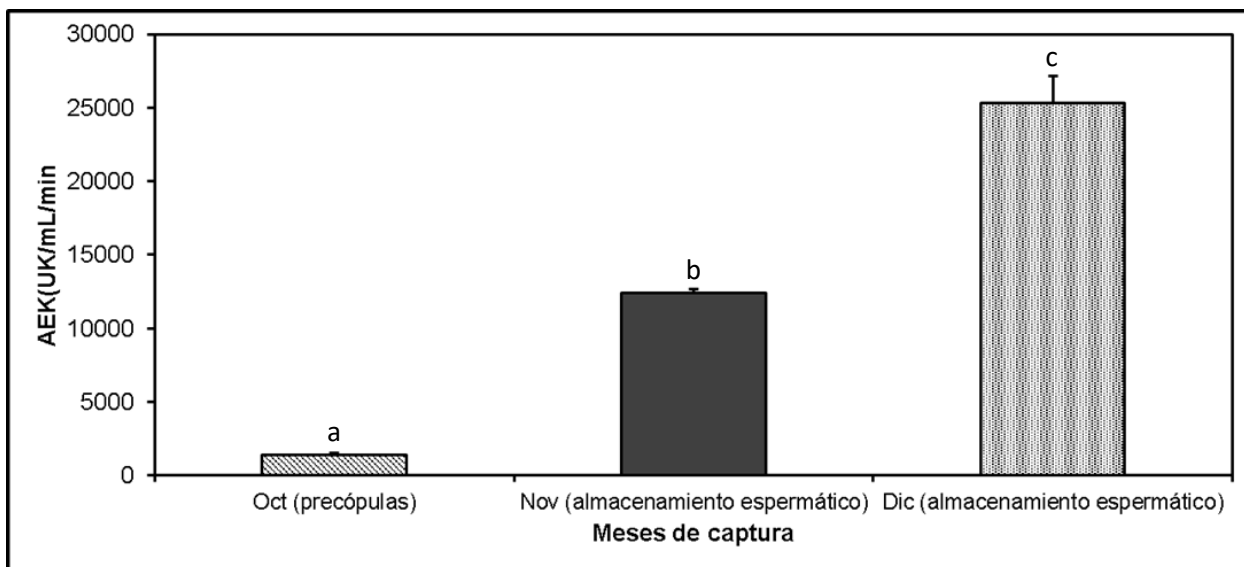


Figura 6 Determinación de la actividad específica de CAT (expresada como K [la tasa constante de la reacción de primer orden]), en fluido genital femenino de *C. mexicanus*, capturadas en octubre de 2019 (precópolas) a diciembre de 2019. Las barras representan los valores promedio \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las medias, $n=3$ hembras por mes.

10. DISCUSIÓN

El almacenamiento prolongado de espermatozoides es una estrategia que algunos vertebrados (reptiles, anfibios, mamíferos) han desarrollado como adaptación a diferentes presiones de selección. Éste fenómeno biológico se define como la permanencia de los espermatozoides viables, en el tracto reproductor de los machos o hembras, que va más allá de sólo algunos días de permanencia como ocurre en la mayoría de los animales (Racey, 1979). En las hembras de algunos mamíferos, esta característica se reduce casi por completo a murciélagos vespertiliónidos con asincronía en las funciones reproductivas de machos y hembras (espermatogénesis y ovogénesis) así como en aquellos con algún tipo de letargo, aunque también se ha reportado para especies de zonas tropicales (Racey, 1982; Krishna, 1999; Crichton, 2000). El almacenamiento prolongado espermático en quirópteros, se puede presentar a nivel de vagina, oviducto y en la unión útero-tubárica (Racey 1979). Una vez que los espermatozoides llegan a la unión útero-tubárica, los gametos masculinos orientan sus cabezas hacia el epitelio ciliado, el cual abunda en esta

región y en el oviducto (Racey, 1979; Uchida & Mori, 1987), el cual proporciona “nutrientes” para la supervivencia del espermatozoide (Krishna, 1997). Sin embargo, del total de espermatozoides que se obtuvieron del aparato reproductor de las hembras de *C. mexicanus*, los resultados de viabilidad fueron menores al 50%, encontrando durante el mes de diciembre el menor porcentaje de viabilidad (33%). En 1999 León-Galván y colaboradores obtuvieron espermatozoides del aparato reproductor femenino de *C. mexicanus*, donde se reportó que en noviembre la concentración espermática fue de 2.86 millones, mientras que en diciembre fue de 0.85 millones; además en ese estudio si se reportaron 2.3 millones a finales del mes de octubre, es decir la fecha más temprana de evidencia de cópula, mientras que en el presente trabajo las capturas de individuos se realizaron a mediados de dicho mes, para asegurar que fuera una etapa previo a los apareamientos. En el mes de noviembre se encontraron 5.41 millones de espermatozoides, mientras que en diciembre 4.58 millones, de los cuales menos del 50% estaban vivos. Una vez que los espermatozoides llegan a la región útero-tubárica, caracterizada por ser una zona estrecha, contorneada y compleja morfológicamente por los pliegues que se forman al ser un sitio de transición al oviducto, es difícil extraer por completo a todos los espermatozoides mediante lavado por reflujo, técnica empleada para la obtención de espermatozoides y fluido genital femenino en el presente estudio. Probablemente, no todos los gametos masculinos de la región útero-oviductal fueron extraídos y la mayoría correspondían a los que se encontraban en la cavidad del útero, razón por la cual el % de viabilidad fue menor al 50%, pues probablemente murieron debido a estrés oxidante o ataque leucocitario.

Aunado a esto, en machos de *C. mexicanus* se han reportado hasta 200 millones de espermatozoides epididimarios en la etapa de cópulas (noviembre-diciembre) (Samano, 2020), datos que concuerdan con la etapa de almacenamiento espermático en hembras; además, esta especie de quiróptero tiene un sistema de apareamiento polígamo promiscuo (López-Wilchis, 1989). Con respecto a los datos obtenidos en el presente estudio, en la concentración espermática, existe una reducción de hasta 195 millones de células en las hembras, mismas que continúan

decreciendo hacia el mes de diciembre. Si bien no se puede esperar que todos los espermatozoides que se encuentran en la cauda del epidídimo sean inseminados en una sola cópula, ya que es un reservorio de espermatozoides ante la presencia de varias hembras receptivas durante un estro prolongado, los machos deben contender con la posibilidad de realizar varias cópulas durante este periodo de apareamiento, o inclusive, la posibilidad de no encontrar pareja por cuestiones de competencia pre-copulatoria. Independientemente de la cantidad de espermatozoides que llegan al útero, el número que alcanza el sitio de almacenamiento es mucho menor (Harper, 1988; Yanagimachi, 1988; Katila, 2001), ya que existen mecanismos de eliminación espermática en el aparato genital de las hembras que permiten que sólo los espermatozoides viables lleguen a la unión útero-tubárica y se almacenen. Una vez que los espermatozoides llegan a esta región, que conforma la segunda “barrera” al ascenso de los espermatozoides, hay diferentes mecanismos de eliminación que permitirán que sólo aquellos viables sean los que se mantengan almacenados (almacenamiento prolongado). Primeramente, el esfínter muscular reduce la luz, regulando el paso de los espermatozoides anómalos (Hafez & Black, 1969); así los espermatozoides con movilidad progresiva pasarían lentamente por la región útero-tubárica y no los hiperactivados ya que este patrón de movimiento está asociado con un incremento de la velocidad pero decremento de la linealidad, así como un incremento de la amplitud del movimiento lateral de la cabeza y el latiguelo del flagelo (Shalgi *et al.*, 1992; Pacheco *et al.*, 2011). Además, en la región útero-tubárica así como en el istmo, existe la presencia de moco que dificulta el paso del espermatozoide a través de esta zona (Jansen, 1980; Suarez, 2004). Se ha asociado a la función de reservorio por las condiciones del medio de cada región: la luz oviductal se reduce por el aumento de la unión del epitelio, restringiendo el desplazamiento de las células; el aumento de la viscoelasticidad en la secreción oviductal que suprime la movilidad; moléculas de adhesión celular (CAM por sus siglas en inglés) presentes en la membrana de los espermatozoides, reconocen residuos de azúcares en el epitelio oviductal favoreciendo la unión a las células ciliadas secretoras del oviducto, modulando el pasaje y proveyendo a los gametos de

nutrientes esenciales previo a la fecundación, ya que se ha demostrado que las células epiteliales responden con síntesis *de novo* de proteínas (Ellington *et al.*, 1993; Hunter, 1987; Smith *et al.*, 1990; Suarez, 1999; Bosch y Wright, 2005). Dentro de estos “nutrientes” y moléculas específicas esenciales se pueden encontrar a las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX

Como se mencionó, existen diferentes mecanismos de eliminación espermática y selección de aquellos gametos idóneos para permanecer almacenados y fertilizar. No obstante, algunas células deben mantenerse viables hasta el momento de la fertilización y ya se han reportado algunos mecanismos involucrados en el mantenimiento de la viabilidad espermática en murciélagos que presentan almacenamiento prolongado en hembras.

Crichton y colaboradores (2000) propusieron que, el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides esta mediada por algún mecanismo supresor a cargo de hormonas esteroides (Racey, 1972; Crichton, 2000; Roy y Krishna, 2011), ya que, en un estudio realizado en hembras de murciélagos del género *Pipistrellus* con almacenamiento espermático durante el invierno, al ser ovariectomizadas, disminuyó la viabilidad espermática en comparación con el grupo control. Esto sugirió que, las hormonas esteroides producidas por el ovario, juegan un papel crucial en la supervivencia de los gametos en algunas especies de murciélagos, pues al retirar la fuente de estrógenos y progestágenos, el endometrio uterino ya no se mantiene en la condición adecuada para la recepción del futuro embrión, provocando la regresión en la vascularización y en las glándulas endometriales, e inclusive, la reducción de los estereocilios de las células epiteliales del sitio de almacenamiento (Crichton, 2000). Comprobado posteriormente por Roy y Krishna en 2010 utilizando hembras de *Scotophilus heathii* donde se observó un aumento en los niveles de testosterona durante el período de almacenamiento espermático, y que al suministrar flutamida (un antagonista o inhibidor de andrógenos), ocasionó cambios degenerativos en los gametos almacenados ya que disminuyó significativamente su viabilidad, así como se observó una disminución significativa en los niveles circulantes de testosterona y androstendiona (Ayub & Levell, 1987; De Leo *et al.*, 1998). En otras especies de

mamíferos ya se ha reportado la participación de las hormonas esteroideas de origen ovárico (estrógenos y progesterona) en la ciliogénesis. Las células ciliadas del epitelio tienen una función secretora que, como se mencionó anteriormente, participan de forma integral proveyendo al espermatozoide de diferentes moléculas, y son abundantes en las etapas foliculares o estrogénicas, mientras que las células no secretoras (no ciliadas generalmente) predominan en las etapas luteínicas. (Brenner, 1975). Esos datos respaldaron otro estudio de Roy y Krishna (2011), donde proponen que la mayoría de vespertiliónidos que muestran almacenamiento prolongado espermático requieren un alto nivel circulante de andrógenos. Por lo anterior, es probable que la acción sinérgica de estrógenos, progestágenos y andrógenos participe también en el mantenimiento de la viabilidad espermática en especies con almacenamiento prolongado.

Por otro lado, Roy y Krishna en 2010 probaron que el tratamiento *in vitro* con testosterona ocasionó aumento de fosforilación de MAP cinasas en espermatozoides localizados en la región útero-tubárica, lo cual deja entrever la posible relación entre el aumento en los niveles de andrógenos durante el almacenamiento prolongado y la activación de cascadas de autorregulación; se sabe que esta ruta de señales de transducción (MAP cinasas) favorece la capacitación de los espermatozoides (Almog & Naor, 2010), evento que termina con la adquisición de la capacidad fértil de los espermatozoides. Además, estudios derivados del almacenamiento natural de los espermatozoides, han resultado tan importantes que sugieren que la capacitación es andrógeno-dependiente (Suarez, 2004). También se reportó un incremento en la síntesis de proteínas Bcl2 en células de esta misma región de almacenamiento espermático en *S. heathii*, lo cual podría ser un indicio de que el tejido también cuenta con mecanismos de mantenimiento para poder proporcionar nutrientes al espermatozoide durante su estancia prolongada (Roy & Krishna, 2011). Esta proteína participa en la vía intrínseca de la apoptosis, así como de inhibir la formación del poro en la membrana y evitar que se libere el citocromo C, para que no ocurra muerte celular (Dai *et al.*, 2016).

Contribuyendo con este conocimiento e intentando esclarecer la gran interrogante sobre los mecanismos que están involucrados en el proceso de almacenamiento prolongado de espermatozoides, se pudo observar que el estado REDOX del tracto genital de las hembras de *C. mexicanus*, también participa en el mantenimiento de la viabilidad de espermatozoides. En 1999, León-Galván y colaboradores proporcionaron evidencias de la participación de agentes reductores presentes en el fluido genital femenino que le confieren protección antioxidante a los espermatozoides durante el almacenamiento prolongado. En el estudio se incubaron con fluido genital de hembras previamente inseminadas, espermatozoides epididimarios de esta especie de quiróptero, así como utilizaron espermatozoides de cerdo como control por la gran cantidad de ácidos grasos insaturados de sus membranas, que los hacen altamente susceptibles a la peroxidación lipídica. Los espermatozoides de ambas especies presentaban una inhibición de la LPX, lo cual sugirió la posible presencia y actividad de antioxidantes en el fluido. Para esclarecer este planteamiento, el presente trabajo respalda el tema del balance de la producción de ERO de los espermatozoides y las enzimas antioxidantes del fluido genital femenino de *C. mexicanus*, medio extracelular que participa en el mantenimiento de la viabilidad de los gametos masculinos durante su almacenamiento prolongado, hasta la fertilización.

Los resultados del presente estudio sugieren que, aun cuando existe un incremento de ERO durante los meses de almacenamiento espermático, éste no es estadísticamente significativo entre meses (noviembre y diciembre), ya que la SOD mantiene una actividad constante formando H_2O_2 , que posteriormente es eliminado por GPX y CAT. El sistema REDOX se mantiene en “equilibrio” debido a la acción de estas moléculas, y así mantener el balance de ERO, lo que coadyuvará para que los espermatozoides adquieran su capacidad fértil (Aitken *et al.*, 1995; Lewis & Aitken, 2001; Rivlin *et al.*, 2004; Zhang & Zheng, 1996; O’Flaherty *et al.*, 2006; Boerke *et al.*, 2013), ya que al incrementar abruptamente la concentración de ERO, podrían tener efectos negativos sobre la oxidación de ácidos grasos insaturados de la membrana

del espermatozoide como se reporta en el trabajo de León-Galván y colaboradores (1999).

Con los resultados obtenidos de la actividad específica de SOD, observamos que, no cambia significativamente en ninguno de los meses de captura, es decir en octubre (precópuas) y posteriores meses de almacenamiento espermático. La función de la SOD es dismutar el O_2^- a una ERO más estable, el H_2O_2 (Konigsberg Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008).

Fisiológicamente, el aumento de la actividad de SOD para la célula, significaría más producción de H_2O_2 en el medio que, si bien no es un radical libre, es el precursor para la formación de la molécula más oxidante de los metabolitos del O_2 , el ión OH^- , pudiendo ocasionar daño oxidante en diferentes biomoléculas de la célula. Así, la sobre producción de H_2O_2 comprometería fácilmente la vida del espermatozoide durante su estancia en el sitio de almacenamiento. La SOD actúa como agente protector manteniendo su actividad sin cambios drásticos en el estado REDOX en los meses de captura, y actuando en conjunto con aquellos agentes reductores que usan como sustrato el H_2O_2 para eliminarlo. Este comportamiento de la enzima destaca la importancia del mantenimiento de los niveles de O_2^- importantes para la fisiología espermática. Ya que, el espermatozoide es una célula transcricionalmente y traduccionalmente silenciada. Así, para que pueda adquirir su capacidad fertilizante, requiere de segundos mensajeros para llevar a cabo diferentes cascadas de señalización durante la capacitación (Aitken, 2017). Se ha propuesto que en los murciélagos que muestran almacenamiento prolongado de espermatozoides como *C. mexicanus* existe un retraso en la capacitación espermática (Krishna y Bhatnagar, 2011, es por ello que, la relación ERO/enzimas anti-ERO, que se plantea, debe mantenerse “en equilibrio” durante el almacenamiento prolongado, y así permitir que las células se capaciten paulatinamente.

Una vez que la SOD ejerce su función dismutando el O_2^- a H_2O_2 , comienza la participación de agentes reductores que eliminen a esta ERO, como la glutatión peroxidasa (GPX). La glutatión peroxidasa es una seleno-enzima con alta afinidad a

su sustrato, y cuando la concentración de peróxido es baja, la GPX actúa (Konigsberg Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008).

En el caso de la actividad específica de GPX en fluido genital femenino de *C. mexicanus*, se observó un aumento significativo en los meses de almacenamiento espermático (noviembre-diciembre) con respecto al control (octubre). Sin embargo, entre los meses de almacenamiento espermático no hubo cambio significativo. Así mismo, esta actividad resultó ser mayor de lo encontrado en machos de esta misma especie de murciélago durante el almacenamiento prolongado de espermatozoides epididimarios por Arenas-Ríos y colaboradores en 2016. Este almacenamiento en machos es de 6 meses, donde la mayor actividad de GPX se registró en octubre, que corresponde a la etapa precopulatoria, con 25 AEGPX (UGPX7mL/min), es decir, menos del 50% de lo encontrado en este mismo mes en fluido genital femenino; una vez que los espermatozoides son eyaculados, en el periodo de apareamiento, y depositados en la vagina, iniciarán otra etapa de almacenamiento de 3 meses en hembras. Es por ello que la actividad antioxidante en estos individuos debe ser mayor, para regular la producción de H_2O_2 derivado del metabolismo del espermatozoide y de las células somáticas del aparato reproductor femenino. Por esta razón, se observa una clara participación de GPX desde el primer mes de almacenamiento (noviembre). Sin embargo, al no observar más cambios en la actividad específica de esta enzima hacia diciembre indica la saturación de la enzima por alta concentración de H_2O_2 . Cuando incrementa la concentración de esta ERO, comienza la acción de otro agente reductor de carácter enzimático, la CAT que su función es la eliminación de H_2O_2 , a altas concentraciones.

La actividad de CAT en el fluido genital femenino de *C. mexicanus* se observa con una tendencia al incremento en cada uno de los meses de captura. En noviembre hay una diferencia significativa en la actividad de CAT (12381 AEK/UK/mL/min), con respecto a octubre (1370 AEK/UK/mL/min). Es decir, una vez que los espermatozoides ingresan al tracto reproductor femenino GPX y CAT actúan de forma sinérgica para eliminar al H_2O_2 producido por los propios gametos masculinos

y las células somáticas del tracto. Posteriormente, hay un aumento significativo en diciembre (25325AEK/UK/mL/min) con respecto a noviembre. Esto resalta la eficiencia enzimática anti-ERO de CAT, para mantener los niveles en la producción de ERO cuando hay un alto contenido de H₂O₂. En diciembre se presenta un pico en la actividad específica de CAT, porque es un tiempo cercano a la ovulación y por tanto a la fertilización, ya que en enero se capturaron hembras ya gestantes, y se agregarían a la producción de ERO los productos del metabolismo del ovocito y posteriormente del embrión.

Cada vez aumentan más las evidencias sobre la regulación de los cambios REDOX de ERO y agentes enzimáticos anti-ERO en ambientes extracelulares con los que interactúan los espermatozoides, debido a que es un aspecto central en diferentes procesos fisiológicos de estas células, entre ellos la capacitación espermática (Aitken, 2017). Se ha demostrado que una serie importante de eventos estructurales y fisiológicos de la capacitación, son susceptibles a la acción de las ERO, es decir, durante el periodo de almacenamiento espermático cuando ocurre la capacitación, el incremento en las ERO representa una amenaza para la integridad estructural y funcional de los espermatozoides, como sería el caso de una alteración en la integridad del ADN, que comprometería dicho evento en el que los espermatozoides adquieren su capacidad fértil (Aitken, 2017; Aitken & Krausz 2001), y la interrupción de la capacidad para fusionarse con el ovocito (Aitken, 2017). Sin embargo, también se sabe que se requiere la presencia controlada de ERO en el ambiente genital femenino, para que el espermatozoide se desarrolle y concluya la capacitación, reacción acrosomal, hiperactivación y singamia.

Los mecanismos por los cuales las ERO participan en la capacitación espermática implican la activación de la adenilato ciclasa (Aitken et al., 1995; Lewis y Aitken, 2001; Rivlin et al., 2004; Zhang & Zheng, 1996), acompañado de la activación de la proteína cinasa A (O'Flaherty et al., 2006); la oxidación del colesterol de la membrana plasmática a oxisteroles y su consiguiente salida de esta región de la célula por medio de la albúmina (Boerke et al., 2013); la activación de proteínas

cinastas reguladas (O'Flaherty et al., 2016); y la inhibición de la actividad de la tirosina fosfatasa (Hecht & Zick, 1992).

La capacitación en mamíferos está regulada, entre otros factores, por reacciones de óxido-reducción. Se ha reportado que el H_2O_2 y el O_2^- tienen un papel fundamental en la regulación positiva (mecanismo activador) en los niveles de AMPc a través de la oxidación de la adenilato ciclasa a nivel de los grupos Tiol de los residuos de cisteína que contiene (Chen et al., 2013; Aitken, 2017).

Por otra parte, se ha visto que las ERO participan en la inhibición de la tirosina fosfatasa y por lo tanto hay un aumento en los niveles de fosforilación de tirosinas que acompañan las señales de transducción en la capacitación. Esta supresión se da a través los residuos de cisteína que posee ya que para que la enzima esté activa requiere encontrarse en un estado reducido. El H_2O_2 producido por el metabolismo del espermatozoide es capaz de ocasionar la oxidación en los residuos de cisteína inactivando la actividad tirosina fosfatasa (Hecht y Zick, 1992; Zhang & Zheng, 1996; Baker *et al.*, 2005; Ickowicz *et al.*, 2012). De esta manera se crea una cascada autorregulada que involucra la generación de las ERO, la activación de la adenilato ciclasa y fosforilación de tirosinas, y la inactivación de la tirosina fosfatasa, para que finalmente, el espermatozoide se capacite (Aitken et al., 1995; Rivlin et al., 2004; Roy y Atreja, 2008) y ocurra la reacción acrosomal (O'Flaherty et al., 1999).

En la membrana de los espermatozoides se encuentra un complejo multiprotéico enzimático que tiene como función la producción de O_2^- , que posteriormente será dismutado a H_2O_2 . Este complejo es denominado NADPH oxidasa o NOX. Se ha reportado que las ERO actúan en conjunto con otros radicales libres como el peroxinitrito (ONOO^-), una especie reactiva de nitrógeno, que provocan la generación de oxisterol, oxidando al colesterol, para su posterior remoción de la membrana mediada por la albúmina (Aitken, 2017).

El incremento en la actividad enzimática antioxidante de GPX y CAT, y el mantenimiento de la producción de ERO sin cambios significativos, en el presente

estudio, sugieren que las enzimas anti ERO no solo participan manteniendo un porcentaje suficiente de espermatozoides viables, a su vez, mantienen un equilibrio en la producción y la participación de ERO, como sucede en otros mamíferos, en los mecanismos de transducción de señales (Fisher y Aitken, 1997) que son regulados en el tracto reproductor femenino del murciélago *C. mexicanus*.

11. CONCLUSIÓN

Las hembras de *C. mexicanus* presentan almacenamiento espermático prolongado, una vez que los espermatozoides ingresan al aparato reproductor femenino son almacenados por tres meses (noviembre, diciembre y enero). Durante su estancia, los espermatozoides están expuestos a los efectos de las ERO y dependen de agentes antioxidantes para que los metabolitos de oxígeno no tengan un efecto negativo, manteniendo la viabilidad de un número suficiente de células espermáticas. La concentración de ERO en espermatozoides no cambia en los meses de almacenamiento, lo que demuestra que las enzimas antioxidantes están participando en la regulación REDOX del fluido genital, promoviendo que las ERO se mantengan sin cambios drásticos y favoreciendo el almacenamiento prolongado. Primeramente la SOD sin cambios significativos en su actividad específica manteniendo una generación constante de H_2O_2 que es eliminado por la GPX y CAT, sinérgicamente y evitando la formación de la molécula más oxidante de las ERO (OH^\cdot).

El presente trabajo en relación con la producción de ERO y la actividad específica de SOD, CAT y GPX resaltan un equilibrio en el estado REDOX que permiten que el espermatozoide se mantenga viable durante el almacenamiento prolongado en hembras de esta especie de quiróptero. Este equilibrio depende, de la relación entre el balance de actividad ERO / anti-ERO durante fechas clave del ciclo reproductivo de *Corynorhinus mexicanus*.

Este es el primer trabajo en proporcionar evidencias de la regulación REDOX en el fluido genital femenino de quirópteros con almacenamiento prolongado de espermatozoides, mediada por la participación de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT).

12. PERSPECTIVAS

El conocimiento generado en el presente estudio podría ser un punto de inicio para el entendimiento de la supervivencia del espermatozoide en periodos prolongados de otras especies de murciélagos. Así mismo, podría ser precursor para la generación de técnicas de reproducción asistida como la conservación de gametos de distintas especies.

Es importante mencionar que existen otros mecanismos que participan en el mantenimiento de la viabilidad espermática, sin embargo, las investigaciones para dilucidarlo por completo aún son escasas. Se podría indagar más sobre la relación en el almacenamiento prolongado de espermatozoides andrógeno-dependiente, así como la participación de las condiciones generales del fluido genital: iones, pH, concentración de diferentes moléculas (proteínas antiapoptóticas, hormonas esteroideas sexuales), así como la participación de otros antioxidantes no enzimáticos como glutatión, vitaminas, melatonina como un potente agente reductor de OH^- , que en conjunto permitirá tener más conocimiento sobre el contenido de este fluido y poder emularlo en un futuro *in vitro*.

13. BIBLIOGRAFÍA

Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, 84, 1039-1052.

Aitken R. J, Krausz C & Buckingham D. (1994). Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ-cells in human sperm suspensions. *Molecular Reproduction and Development*, 39, 268–279.

Aitken, R. J., & Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122(4), 497-506.

Aitken, R. J., Buckingham, D. W., & West, K. M. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol-and

lucigenin-dependent chemiluminescence. *Journal of cellular physiology*, 151(3), 466-477.

Aitken, R. J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D. W., & Van Duin, M. (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science*, 108(5), 2017-2025.

Almog T & Naor Z. (2010). The role of mitogen activated protein kinase (MAPK) in sperm functions. *Molecular Cell Endocrinology*, 314,239–243.

Alvarez JG & Storey BT. (1984). Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 30,833-841.

Arenas-Ríos, E. (2004). Participación de las enzimas anti-substancias reactivas de oxígeno (SRO) en las funciones testiculares y epididimarias en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

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 de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.

Arenas-Ríos, E., Adolfo, R. G., Edith, C. B., Mina, K., Marcela, A. S., Ahiezer, R. T. & Angel, L. G. M. (2016). Reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity during epididymal sperm maturation in *Corynorhinus mexicanus* bat. *Reproductive biology*, 16(1), 78-86.

Arenas-Ríos, E., Rodríguez-Tobón, A., Trinidad, B. P. L., Sandoval, F. M. R., Tobón, E. R., Jimenez-Salazar, J. E., & León-Galván, M. A. (2014). Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(73) 73-81.

Ayub M & Levell MJ. (1987). Inhibition of rat testicular 17 α -hydroxylase and 17, 20-lyase activities by anti-androgens (flutamide, hydroxyflutamide, Ru23908, cyproterone acetate) in vitro. *Journal of Steroid Biochemestri* 28:43–47.

Babior BM, El Benna J, Chanock SJ & Smith RM. (1997). The NADPH oxidase of leukocytes: The respiratory burst oxidase. In *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 737-784.

Baker MA, Krutskikh A, Curry BJ, Hetherington L & Aitken RJ (2005). Identification of cytochrome-b5 reductase as the enzyme responsible for NADH-dependent lucigenin chemiluminescence in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 73: 334–342.

Baker MA, Krutskikh A, Curry BJ, McLaughlin EA y Aitken RJ (2004). Identification of cytochrome p450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations. *Biology of Reproduction*, 71,307-318.

Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejdr P, Seed MC y Thomas M (1983). Flow Cytometry studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology* 130(4), 1910–1917.

Bhatt P, Kadam K, Saxena A, Natraj U (2004): Fertilization, embryonic development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal glycoprotein. *Indian J Experimental Biology*, 42, 1043-1055.

Boerke, A., Brouwers, J. F., Olkkonen, V. M., van de Lest, C. H., Sostaric, E., Schoevers, E. J., & Gadella, B. M. (2013). Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biology of reproduction*, 88(1), 21-1.

Bosch, P., & Wright Jr, R. W. (2005). The oviductal sperm reservoir in domestic mammals. *Archivos de medicina veterinaria*, 37(2), 95-105.

Brenner, R.M. & West, N.B. 1975. Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. *Annual Review of Physiology* 37: 273-303.

Cathcart R, Schwiers E & Ames BN (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Annals of Biochemistry and Experimental Medicine* 134(1): 111–116.

Cervantes DLI, Arenas-Ríos E, León-Galván MA, López-Wilchis R, Ambríz GD & Rosado GA (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54,196-204.

Chen, S., Meng, X. F., & Zhang, C. (2013). Role of NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species in podocyte injury. *BioMed research international, J Cell Sci* 108, 2017-2025.

Corrales, L & M. Muñoz-Ariza. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250.

Cota-Magaña, A. (2014). Actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, en el espermatozoide y líquido seminal de conejo Nueva Zelanda y su relación con el sobrepeso. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

Crichton, E. G., & Krutzsch, P. H. (2000). *Reproductive biology of bats*. Academic Press.

Crichton, E. & P. Krutzsch. (2000). *Reproductive Biology of Bats: Anatomy and physiology of the female reproductive tract*. Academic press. Pp. 157-208.

Dai, C., Li, B., Zhou, Y., Li, D., Zhang, S., Li, H. & Tang, S. (2016). Curcumin attenuates quinocetone induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF-kB pathway in human hepatocyte L02 Cells. *Food and Chemical Toxicology*, 95, 52-63.

De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., & Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, 2(1), 48-54.

De Leo V, Lanzetta D, D'Antona D, la Maarca A, & Morgante G. (1998). Hormonal effects of flutamide in young women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83:99–102.

Ellington, J. E., Igotz, G. G., Varner, D. D., Marcucio, R. S., Mathison, P., & Ball, B. A. (1993). In vitro interaction between oviduct epithelia and equine sperm. *Archives of andrology*, 31(2), 79-86.

Fisher, H. M., & Aitken, R. J. (1997). Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *Journal of Experimental Zoology*, 277(5), 390-400.

Gómez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS & Aitken RJ. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: Correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology*, 17, 276–287.

Gómez Q. L.E., & D.B. Cuevas. (2008). Superóxido dismutasa. Cap. 11 169-182pp. En *Radicales libres y estrés oxidativo, aplicaciones médicas*. Konigsberg F. M. Compiladora. El manual moderno.

Gu, W., & Hecht, N. B. (1996). Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *Journal of andrology*, 17(3), 256-262.

Gualtieri, R., & Talevi, R. (2003). Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction*, 125(2), 251-258.

Hafez, E. S. E., & Black, D. L. (1969). The mammalian uterotubal junction. *The Mammalian Oviduct*, 85-126.

Halliwell, B. G. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. In *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, UK, 10-50 pp.

Harper, M.J.K. (1988). Gamete and zygote transport. Cap: 1, 103–134pp. In: Knobil and Neill's physiology of reproduction, Plant, T. M., & Zeleznik, A. J.

Hecht, D., & Zick, Y. (1992). Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. Biochemical and Biophysical Research Communications, 188 (2), 773-779.

Heffetz, D., Bushkin, I., Dror, R., & Zick, Y. (1990). The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. Journal of Biological Chemistry, 265 (5), 2896-2902.

Holland MK, Alvarez JG & Storey BT. (1982). Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal sperm. Biology of Reproduction, 27, 1109-1118.

Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. Cell, 50 (6), 823-829.

Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. Asian journal of andrology, 14(6), 816.

Jansen, R. P. (1980). Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. American journal of obstetrics and gynecology, 136(3), 292-308.

Katila, T. (2001). Sperm–uterine interactions: a review. Animal reproduction science, 68(3-4), 267-272.

Konigsberg-Fainstein, M. y Aguilar-Maldonado. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. México. Manual Moderno.

Koppers AJ, De Iulius GN, Finnie JM, McLaughlin EA, & Aitken RJ (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 93, 3199- 207.

Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., & du Plessis, S. S. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 425-435.

Krishna, A. (1997). The relationship between spermatozoa and epithelium of the female genital tract during sperm storage in the greater yellow bats (*Scotophilus heathi*): the light and electronmicroscopic observations. *Proceedings of the National Science Council, Life sciences*, 21(1), 31-36.

Krishna, A. (1999). Reproductive delays in chiropterans. *Topics in endocrinology and reproduction*, 410-421.

Krishna, A., & Bhatnagar, K. P. (2011). Hormones and reproductive cycles in bats. In *Hormones and reproduction of vertebrates*. Academic Press. Norris, D, O & K. H, López.

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

Lapointe J, Bilodeau JF (2003): Antioxidant Defenses Are Modulated in the Cow Oviduct During the Estrous Cycle. *Biology of Reproduction*, 68, 1157-1164.

Lapointe S, Sullivan R, & Sirard MA (1998): Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biology Reproduction*, 58, 747-753.

León-Galván MA, López-Wilchis MA, Hernández OP, 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.

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.

Lewis, B., & Aitken, R. J. (2001). A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *Journal of andrology*, 22(4), 611-622.

López-Wilchis R. (1989). *Biología de Plecotus mexicana* (Chiroptera: Vespertilionidae) en el estado de Tlaxcala, México. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.

McNutt-Scott TL, & Harris C (1998): Modulation of intracellular glutathione and cysteine metabolism in bovine oviduct epithelial cells cultured in vitro. *Biology of Reproduction*, 59, 314-20.

O'Flaherty CM, Beorlegui NB, & Beconi MT (1999): Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology*, 52, 289-301.

O'Flaherty, C., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(4), 528-540.

Pacheco, J., Villalta, P., & Barriga, D. (2011). Patrones de movimiento en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*): observaciones ex situ. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(2), 121-124.

Pollard, J. W., Plante, C., Allan King, W., Hansen, P. J., Betteridge, K. J., & Suarez, S. S. (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biology of reproduction*, 44(1), 102-107.

Racey, P. A. (1972). Viability of bat spermatozoa after prolonged storage in the epididymis. *Reproduction*, 28(2), 309-311.

Racey, P. A. (1979). The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *Reproduction*, 56(1), 391-402.

Racey, P. A. (1982). Ecology of bat reproduction. In *Ecology of bats*. Springer, Boston.

Riley, J. C., & Behrman, H. R. (1991). Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 198(3), 781-791.

Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction*, 70(2), 518-522.

Rodriguez-Martinez H (2007): Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 68S, 138-146.

Rodríguez-Tobón, A., E., Arenas-Ríos & M., León-Galván. (2010). El almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, adaptación que permite sincronizar el periodo de apareamiento en murciélagos. *Contactos*: 78, 58-64.

Ross MH, & Pawlina W (2011): Female Reproductive System. In: *Histology A Text and Atlas*. Lippincott Williams & Wikins, pp.845-848.

Roy, S. C., & Atreja, S. K. (2008). Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Animal reproduction science*, 107(1-2), 68-84.

Roy, V. K., & Krishna, A. (2010). Evidence of androgen-dependent sperm storage in female reproductive tract of *Scotophilus heathi*. *General and comparative endocrinology*, 165(1), 120-126.

Roy, V. K., & Krishna, A. (2011). Sperm storage in the female reproductive tract of *Scotophilus heathii*: role of androgen. *Molecular reproduction and development*, 78(7), 477-487.

Samano-Barbosa, G. A. (2021). Marcadores apoptóticos como evidencia de maduración epididimaria en espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

Segal AW & Abo A. (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends BiochemSci*, 18, 43–47.

Shalgi, R., & Raz, T. (1997). The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization. *Histology and histopathology*. 12, 813-822.

Smith, T., & Yanagimachi, R. (1990). The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biology of Reproduction*, 42(3), 450-457.

Suarez, S. S. (1999). Regulation of sperm transport in the mammalian oviduct. The male gamete. Cache river press, Vienna, 71-80.

Suarez, S. S. (2004). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 455-462.

Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana.

Tosic, J., & Walton, A. (1950). Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. *Biochemical Journal*, 47(2), 199-212.

Uchida, T. A., Mori, T., & Son, S. W. (1988). Delayed capacitation of sperm in the Japanese house bat, *Pipistrellus abramus*. *Journal of the Mammalogical Society of Japan*, 13(1), 1-10.

Vandaele L, Thys M, Bijttebier J, Langendonck AV, Donnay I, Maes D, & Meyer E, Soom AV. (2010): Short term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. *Society for Reproduction and Fertility*, 1470-1626.

Yanagimachi, R. (1988). Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*, 135-185.

Zhang, H., & Zheng, R. L. (1996). Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions. *Free radical research*, 25(4), 347-354.