



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Análisis macro y microestructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

Biol. AHIEZER RODRÍGUEZ TOBÓN

Comité Tutorial

DIRECTOR: Dr. MIGUEL ANGEL LEÓN GALVÁN
ASESORA: Dra. EDITH ARENAS RÍOS
ASESOR: Dr. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
ASESORA EXT: Dra. GISELA FUENTES MASCORRO

México, D.F.

2011

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Miguel Angel León Galván
Departamento de Biología, UAM-I.
león@xanum.uam.mx

Asesora

Dra. Edith Arenas Ríos
Departamento de Biología de la Reproducción,
UAM-I.
editharenas2000@yahoo.com.mx

Asesor

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.
bet@xanum.uam.mx

Asesora Externa

Dra. Gisela Fuentes Mascorro
Laboratorio de Investigación en Reproducción
Animal, UABJO.
lirauabjo@gmail.com

“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia de CONACyT (PNPC) registro 001481 y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”

Los integrantes del jurado, designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis titulada “Análisis macro y micro estructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. El examen se realizó el día 08 de diciembre de 2011.

Presidente

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.

Secretario (a)

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM.

Vocal

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
Instituto Nacional de Pediatría, INP.

Vocal

Dra. Edith Arenas Ríos
Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres: María Magdalena Tobón García y Carlos Rodríguez Fuentes, por darme todo su apoyo.

A mi esposa Esmeralda Lagunas Sandoval, por acompañarme en este camino de tantos tropiezos, desveladas y sacrificios.

A mi hijo Joshua Mihael Rodríguez Lagunas, por ser el motor que impulsa todo mi ser.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT por la beca No 39039, otorgada para la realización de ésta investigación, durante la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

A la Dra. Edith Arenas Ríos, por ser aparte de una excelente profesora, una muy buena amiga.

Al Dr. Miguel Angel León Galván, por brindarme todo su apoyo durante la realización de está tesis.

Al Dr. Adolfo Rosado García, por enseñarme que siempre hay algo más y que nunca es suficiente.

A la Dra. Gisela Fuentes Mascorro y al Dr. José Miguel Betancourt Rule, por estar siempre al pendiente de esta investigación y aconsejarme siempre que lo necesite.

A la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor y a la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza por favorecer a las mejoras de este trabajo.

A la Dra. Reyna Fierro Pastrana y al Dr. Demetrio Alonso Ambriz García, por brindarme todo su apoyo incondicionalmente.

Y en general a las familias Tobón García, Lagunas Sandoval y Villafuerte Rodríguez, especialmente a ese angelito que ahora me cuida desde el cielo.

RESUMEN

El proceso de maduración epididimaria de los espermatozoides comprende una serie de eventos morfológicos y bioquímicos orquestados por los diferentes tipos celulares que se encuentran en el túbulo epididimario, y que modifican secuencialmente al espermatozoide durante su tránsito a lo largo del túbulo epididimario para conferirle las características necesarias para poder realizar adecuadamente la fertilización del óvulo. En la actualidad se considera que para la mayoría de los mamíferos es en las dos primeras regiones del epidídimo, cabeza y cuerpo, donde ocurre la maduración espermática, culminando antes de su entrada a la región caudal.

El murciélago Vespertiliónido, *Corynorhinus mexicanus* presenta un patrón reproductivo temporalmente asincrónico tanto entre el testículo y el epidídimo en general, como entre las diversas regiones del epidídimo, lo cual se refleja en la presencia de un almacenamiento de espermatozoides en la cauda del epidídimo por un periodo de hasta 4 meses. En este quiróptero se ha sugerido, por evidencias fisiológicas y morfológicas, que el proceso de maduración espermática requiere un tiempo inusualmente más largo en comparación con el reportado para el resto de los mamíferos, terminando en la región caudal del epidídimo; esto permite plantear que en este tipo de murciélagos con patrón reproductivo masculino asincrónico, la lenta maduración de los espermatozoide puede estar relacionada directamente con el largo periodo de almacenamiento en la cauda del epidídimo. El objetivo de la presente investigación fue analizar histológicamente el epidídimo de *C. mexicanus* a lo largo de un ciclo reproductivo anual para determinar la relación que existe entre el

epidídimo con la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides en esta especie.

En el epidídimo de *C. mexicanus* se pudieron reconocer adecuadamente las tres regiones anatómicas (caput, corpus y cauda). Estas tres regiones del epidídimo presentan cambios histológicos importantes conforme avanza el ciclo de reproducción en los murciélagos. La histología muestra que existe involución de la cabeza del epidídimo un mes antes que se inicie la regresión de la cauda, lo cual sustenta los cambios morfológicos que hemos reportado previamente para éste órgano. El análisis morfométrico del túbulo epididimario, comparativamente entre las 3 regiones anatómicas, permitió determinar que existe una clara diferencia en el área total del túbulo, en el área de la luz y en el área del tejido epitelial del túbulo epididimario de la región caudal, con respecto a las otras dos regiones, observándose un incremento en los valores de estas variables que se observa claramente a partir de agosto-septiembre, manteniéndose los valores más altos para el túbulo de la región caudal hasta diciembre.

Se registró la presencia de células principales a lo largo de las tres regiones epididimarias. Adicionalmente y con base en las características morfológicas, en el mes de febrero, se lograron identificar células apicales en la región del cuerpo y células claras en la región caudal. En el mes de septiembre, para la región cefálica se encontraron distintos tipos celulares (basales, claras, estrechas y halo); en la región del cuerpo, solamente se observaron células basales; y en la cauda del epidídimo células basales, claras y halo. En el mes de octubre, se reconoció la

presencia de células apicales y basales en la región corporal del epidídimo, y células basales en la cauda. Para el mes de diciembre, tanto en la región cefálica como en el cuerpo del epidídimo se observaron células basales.

El espermatozoide de *Corynorhinus mexicanus* tiene una longitud total de 73 ± 6.4 μm ($X \pm \text{D.E.}$). Su cabeza, en forma de espátula, mide 2 ± 0.1 μm de ancho y 5.2 ± 0.5 μm de largo. Se reconoció el espacio subacrosomal, el perforatorium y es evidente la presencia de un amplio segmento ecuatorial. En la pieza de unión se pudo determinar la presencia del centriolo proximal y el plato basal, observándose un cuello muy estrecho. La longitud del flagelo es de 67.7 ± 6.4 μm . El axonema muestra la típica conformación de “9 + 2” microtúbulos. También se observaron la vaina mitocondrial, característicamente de diámetro grande, el filamento axial, otras fibras densas y el annulus. Como evidencia de inmadurez, en los espermatozoides de la región caudal se registró una alta frecuencia de gota citoplasmática y un acrosoma más grueso, claramente visible en el extremo apical.

Las evidencias histológicas y ultraestructurales obtenidas permitieron a su vez reconocer aspectos funcionales del epidídimo de *C. mexicanus* en sus tres regiones anatómicas, las cuales indican que el proceso de maduración espermática ocurre gradualmente, desde la región cefálica, terminando en esta especie en la región caudal a diferencia de lo reportado para otros mamíferos, lo cual podría parcialmente explicar la necesidad del prolongado almacenamiento de espermatozoides.

ABSTRACT

Epididymal maturation of sperm comprises a series of events regulated by the specific functioning of the different cell types found in the different anatomical regions of the epididymal tubule. This interaction sequentially modifies the sperm during their transit along the epididymal tubule. At present it is considered that, for most mammals, the first two regions of the epididymis, caput and corpus, represent the area where sperm maturation occurs, concluding almost always before sperm entry into the caudal region.

Vespertilionids bat, *Corynorhinus mexicanus* has an asynchronous reproductive pattern which includes a long time of sperm storage (3-5 months) on the cauda epididymis even after the complete involution of the testes and of the other two epididymal regions. It has been suggested, by physiological and morphological evidences that in these bat species sperm epididymal maturation requires an unusually prolonged time, when compared with that reported for other mammals, and that characteristically is concluded in the caudal region of the epididymis. This fact allows us to suggest that the slow maturation of sperm can be directly related with the long storage time of sperm cells in the cauda epididymis.

In this work we try to show the possible relationships between anatomical and histological characteristics of the different epididymal regions studied throughout one complete reproductive annual cycle in *C. mexicanus* to determine the relationship between these epididymal properties and the maturation and sperm storage in this species.

Epididymis of *C. mexicanus* shows the three classical anatomical regions (caput, corpus and cauda), and all of them can be satisfactorily isolated and independently studied. These three regions of the epididymis show significant histological changes with the reproductive cycle in bats. Histology shows that there is involution of the epididymis head one month before the start of tail regression, which supports the morphological changes we previously reported for this organism. Quantitative and careful morphometric comparison of the 3 anatomic regions of the epididymal tubule allowed us to show the existence of clear differences between the total area, the lumen area and the epithelial area of the epididymal tubule particularly with respect to the caudal region when compared with the other two epididymal regions, being usually highest in the caudal region principally between September and December.

The sperm of *C. mexicanus* has a total length of $73 \pm 6.4 \mu\text{m}$. His spatula-shaped head was $2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ wide and $5.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ long. The subacrosomal space, the equatorial segment and the perforatorium were easily observable. In the connecting piece the presence of the proximal centriole and the basal plate could be determined, showing a very narrow neck. The length of the flagellum was $67.7 \pm 6.4 \mu\text{m}$. The axoneme shows the typical "9 + 2" microtubules formation. It is important to mention, as evidence of the lack of adequate maturity of the caudal sperm, a high frequency of cytoplasmic droplet and a thicker acrosome clearly visible in the apical extreme of the sperm cells.

We may conclude that the histological and ultrastructural evidence obtained in this work indicate that the sperm maturation process occurs gradually, it initiates as is

commonly observed at the level of the head region, but ends in the caudal region, unlike that reported for other mammals. Our results can partially explain the need for prolonged caudal epididymal storage of sperm in these bat species that show reproduction asynchrony.

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Estructura del Epidídimo.....	2
I.1.1 Características y funciones de las células epiteliales.....	3
I.2 Funciones del Epidídimo	8
I.2.1 Transporte de espermatozoides.....	8
I.2.2 Maduración espermática.....	10
I.2.3 Almacenamiento de espermatozoides.....	16
I.3 Regulación de las funciones epididimarias.....	18
I.4 Morfología y ultraestructura del espermatozoide epididimario.....	20
II. ANTECEDENTES	27
II.1 Asincronía temporal de las funciones sexuales masculinas y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo en los murciélagos.....	27
II.2 La maduración y el almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i>	33
III. HIPÓTESIS	36
IV. JUSTIFICACIÓN	36

V. OBJETIVO GENERAL.....	37
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
VII.1 Obtención de los murciélagos de estudio.....	38
VII.2 Obtención y procesamiento de los epidídimos y espermatozoides.....	39
VII.2.1 Preparación para microscopia de luz transmitida.....	39
VII.2.2 Morfometría de espermatozoides.....	39
VII.2.3 Histología y morfometría del túbulo epididimario.....	40
VII.2.4 Preparación para microscopía electrónica de barrido y de transmisión...	41
VII.3 Análisis estadístico.....	41
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
VIII.1 Descripción morfológica del epidídimo y relación con su función en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i>	42
VIII.1.1 Características anatómicas e histológicas.....	42

VIII.1.2 Morfometría comparativa del túbulo epididimario en las tres principales regiones anatómicas del epidídimo.....	58
VIII.2 Características morfológicas de los espermatozoides epidídimarios en relación con su maduración en el murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i>	65
VIII.2.1 Morfometría y ultraestructura.....	65
IX. CONCLUSIONES.....	73
X. ANEXO I.....	74
Medios (ANEXO I)	
Reactivos y Soluciones (ANEXO I)	
Tinción de Eosina-Nigrosina	
Tinción de Hematoxilina-Eosina	
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	76

I. INTRODUCCIÓN

Algunas de las propiedades fisiológicas más importantes de los espermatozoides de los mamíferos, como son: el potencial para moverse direccionalmente, la interacción con la zona pelúcida, y la fertilización del ovocito, se desarrollan gradualmente, en cada especie de manera específica, cuando estas células progresan de la región cefálica a la región caudal del epidídimo (Aitken *et al.*, 1998; Okamura, 1998; Lewis y Aitken, 2001; Lorenzana *et al.*, 2006). Estos cambios son conocidos como maduración espermática epididimaria y en la mayoría de las especies estudiadas, se realiza en un tiempo menor a 10 días y termina antes de que los espermatozoides alcancen la región caudal (Rowley *et al.*, 1970; Robaire *et al.*, 2006). Sin embargo, para el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, el cual presenta un solo ciclo reproductivo al año, lleva a cabo un almacenamiento prolongado de espermatozoides en la cauda epididimaria durante otoño e invierno temprano (León-Galván *et al.*, 2005). En este quiróptero se ha sugerido por evidencias fisiológicas, que el proceso de maduración espermática requiere un tiempo inusualmente más largo en comparación con el reportado para el resto de los mamíferos, terminando en la región caudal del epidídimo, asociado al tiempo de almacenamiento espermático (Cervantes *et al.*, 2008). El presente trabajo tiene como objetivo, reconocer las características histológicas del epidídimo de *C. mexicanus* que sustenten la hipótesis de una lenta maduración de espermatozoides, culminando en la cola del epidídimo.

I.1 Estructura del Epidídimo

El epidídimo es un simple pero convolucionado túbulo que puede medir de 3 a 80 m (Robaire y Viger, 1995), siendo 1 m en el ratón, 3 m en la rata, de 3 a 6 m en el humano y más de 80 m en el caballo (Robaire *et al.*, 2006). En la mayoría los casos se pueden distinguir claramente tres regiones anatómicas, además del segmento inicial; a) cabeza, que recibe a los espermatozoides y fluido de los vasos eferentes testiculares; b) cuerpo, más estrecho, que conecta con la última región; c) cola, con una apariencia globosa que, se encarga de almacenar los espermatozoides hasta la eyaculación (Cooper, 1999; Robaire *et al.*, 2006; Setchell y Breed, 2006; Sullivan *et al.*, 2007).

Cada región epididimaria es dividida aun más en segmentos intra-regionales, que consisten en lóbulos de túbulo epididimario enroscado, contorneado por septos de tejido conectivo (STC). El número de segmentos en el epidídimo varía de acuerdo a la especie (Turner *et al.*, 2003). El túbulo epididimario va descendiendo a través de cada STC, hasta llegar a la parte más distal del segmento. Se considera que cada STC le brinda soporte y estabilidad al órgano en sí, pero además de éstas características, proporciona el microambiente necesario para los espermatozoides, puesto que la expresión de genes y síntesis de proteínas difieren entre cada región del epidídimo, como en el caso de la cabeza y cuerpo, en donde se lleva a cabo la maduración de espermatozoides, y la cola, en donde se da el almacenamiento espermático (Turner *et al.*, 2003; Robaire *et al.*, 2006). Además de los STC que se

encuentran a lo largo del epidídimo, el epitelio epididimario también participa en la formación de un ambiente adecuado para los espermatozoides.

Se ha determinado que las células presentes en el túbulo epididimario forman una barrera hemato-epididimaria, la cual se pudo observar por la formación de uniones estrechas entre células principales adyacentes del tejido epitelial, esta barrera permite el mantenimiento de un microambiente luminal para el mantenimiento de los espermatozoides, por la restricción del paso de numerosos iones, solutos, y macromoléculas que cruzan el epitelio epididimario (Chricton *et al.*, 1994; Serre y Robaire, 1998; Robaire *et al.*, 2006).

I.1.1 Características histológicas y funcionales de las células epiteliales

En el epidídimo podemos encontrar diversos tipos celulares encargados de la síntesis, secreción y absorción de sustancias que entrarán en contacto directo con los espermatozoides, células principales, basales, halo, claras, estrechas, y apicales (Figura 1) (Serre y Robaire, 1998). El epitelio epididimario favorecerá un ambiente luminal para la adquisición de la habilidad fertilizante, movilidad en los espermatozoides, además de su almacenamiento (Serre y Robaire, 1998).

En el epitelio del epidídimo predominan las células principales, las cuales son altas ya que se extienden desde la membrana basal, donde se localiza el núcleo al borde del lumen tubular. La característica más llamativa de estas células es su maquinaria endocítica y secretoria muy desarrolladas. Las células principales presentan diferencias estructurales y funcionales en cada región del epidídimo, que se reflejan

en la apariencia y organización del aparato secretor (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, y gránulos secretores) y aparato endocítico (vesículas, endosomas, cuerpos multivesiculares, y lisosomas), la endocitosis de material existente en el lumen puede ocurrir por fase fluida, absorción o mediado por transportadores. Las células principales transportan sodio a su interior desde el lumen por medio de canales de sodio-potasio, sintetizan un gran número de proteínas que son retenidas en la misma célula o secretadas al lumen del epidídimo, por lo que se ha sugerido que desempeñan un papel en la maduración de los espermatozoides (Hermo, 1995; Hermo y Robaire, 2002; Robaire *et al.*, 2006).

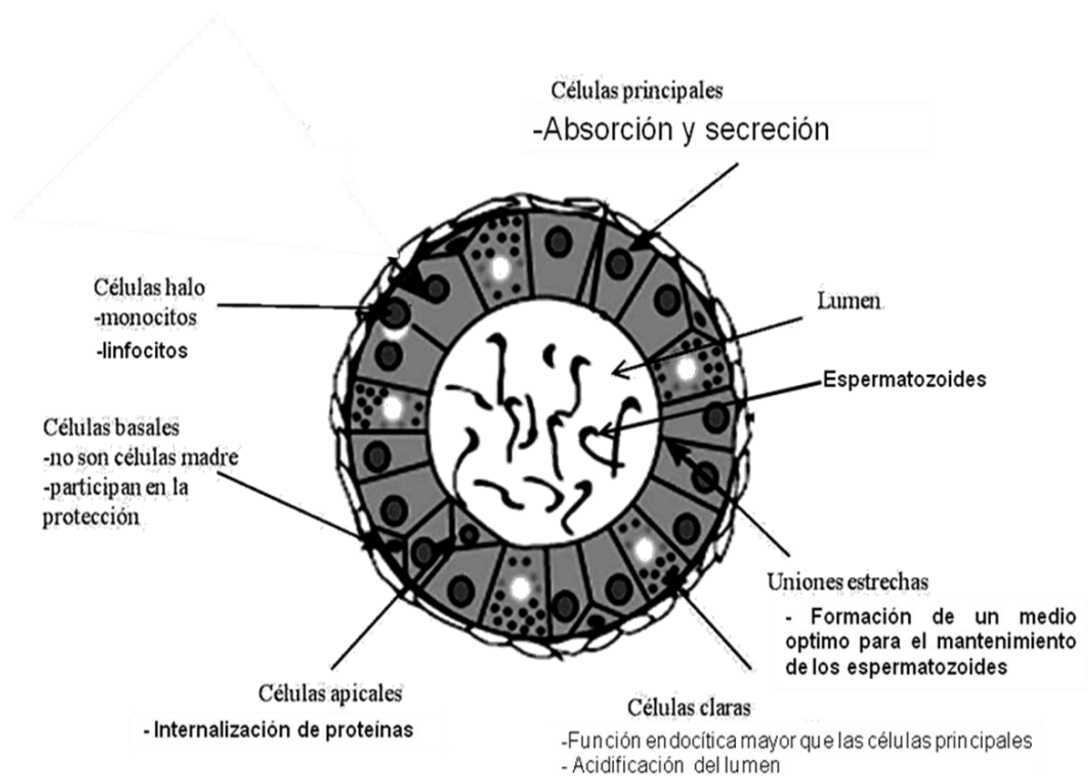


Figura 1. Esquema ilustrativo del tubo epididimario en corte transversal, donde se muestra el epitelio de tipo pseudoestratificado, conformado por los diferentes tipos celulares (indicando su función principal) que pueden presentarse a lo largo del tubo (Modificado de: Setchell y Breed, 2006).

Las células apicales han sido descritas previamente en la parte inicial y la zona intermedia del epidídimo de la rata adulta y ocasionalmente en otros segmentos epididimarios en ratas de edad avanzada (Adamali y Hermo 1996). Estas células se asemejan a las células principales, pero a diferencia, estas células tienen un característico núcleo esférico situado apicalmente y no tienen contacto con la membrana basal (Adamali y Hermo 1996; Robaire *et al.*, 2006). Debido a que participan también en procesos de secreción y endocitosis, se ha considerado que modifican el ambiente luminal del túbulo epididimario, puesto que están involucradas en la degradación y eventual internalización de proteínas. (Adamali y Hermo 1996; Andonian y Hermo, 1999).

Las células estrechas, así como las células apicales sólo aparecen en el epitelio del segmento inicial y la zona intermedia del epidídimo de rata y ratón. Se caracterizan por numerosas vesículas apicales localizadas en forma de copa que están involucradas en la endocitosis, además de que secretan iones H^+ hacia la luz del túbulo epididimario. Estas células se diferencian morfológicamente de las células principales y apicales por la expresión de diferentes proteínas, y también por que pueden ser precursores de células claras (Adamali y Hermo, 1996; Serre y Robaire, 1998; Andonian y Hermo, 1999; Robaire *et al.*, 2006).

Las células claras no están presentes en el segmento inicial del epidídimo de rata (Moore y Bedford, 1979), pero en muchas especies incluyendo al humano, las podemos encontrar en las tres regiones del epidídimo (Robaire *et al.*, 2006). Se caracterizan por una región apical con numerosas depresiones revestidas,

endosomas, cuerpos multivesiculares, y lisosomas, una región basal donde se ubica el núcleo y una cantidad variable de gotas lipídicas. La función endocítica de estas células es mucho mayor que la correspondiente realizada por las células principales adyacentes, sobre todo en la cola del epidídimo, además, participan junto con las células estrechas en la acidificación del fluido luminal (Hermo *et al.*, 1988; Oko *et al.*, 1993; Andonian y Hermo, 1999; Robaire *et al.*, 2006).

Las células claras son consideradas especializadas en la fagocitosis, se distinguen de las demás células epiteliales, puesto que desarrollan micropliegues en la superficie, en donde se pueden observar microvellosidades en la parte apical de la célula (Robaire *et al.*, 2006), siendo simplemente estereocilios en células no especializadas, las cuales son morfológicamente similares (Temple-Smith, 1984).

Las células Halo son células pequeñas con un estrecho borde citoplasmático, están presentes en todo el epidídimo. Estas células se encuentran normalmente en la base del epitelio y contienen un núcleo conformado por un variable número de gránulos densos. Han sido descritas como linfocitos o monocitos, sólo que no son linfocitos típicos migratorios, entre las principales diferencias son, sus gránulos que contienen cuerpos multivesiculares y un gran retículo endoplásmico. Estos dos tipos de células son difíciles de distinguir por técnicas convencionales de microscopia, debido a su similitud en tamaño y la morfología nuclear (Robaire *et al.*, 2006).

Las células basales, también, se encuentran en todo el túbulo epididimario de rata, forman una red con las células principales, son hemisféricas en apariencia, aunque

pueden tener forma curva o triangular (Olson *et al.*, 1995; Robaire *et al.*, 2006). Se ha propuesto que las células basales pueden tener un origen extratubular (Robaire *et al.*, 2006). Se encuentran adheridas a la base membranar del túbulo y no tienen acceso directo al lumen, aunque los procesos de estas células en algún momento se extienden hacia el lumen (Olson *et al.*, 1995; Robaire *et al.*, 2006). Poseen depresiones recubiertas, sobre la superficie de su membrana, opuesta a la membrana basal y cubriendo a las células principales, lo que sugiere que el receptor mediador de factores endocíticos deriva de la sangre o de las células principales.

Las células basales del epidídimo de rata, presentan altos niveles de inmunorreactividad para glutatión transferasa, lo cual sugiere que éste tipo celular puede brindar protección contra especies reactivas de oxígeno, además de participar en la maduración y almacenamiento espermático (Yeung *et al.*, 1994). También muestran una acumulación de un material de secreción en sáculos de Golgi, distintos gránulos secretorios aparecen junto al Aparato de Golgi, como se observa en otras células secretoras. Estudios con anticuerpos específicos indican que las células basales se pueden considerar como macrófagos maduros, similares en apariencia a los macrófagos peritubulares y las células basales (núcleo, organelos citoplásmicos, procesos, cuerpos densos). Además de que los macrófagos peritubulares son ocasionalmente localizados en muescas del epitelio epididimario, donde están ausentes las células basales (Yeung *et al.*, 1994).

Dentro del epitelio del epidídimo se han descrito para una gran variedad de especies, secreciones clásicamente de tipo exocrinas, aunque ya se ha podido

determinar la existencia de secreciones apocrinas, en donde existe la formación de burbujas o vesículas, denominadas aposomas o epididimosomas (Rejraji *et al.*, 2006). Los epididimosomas son heterogéneos en tamaño (50 a 500µm) y contenido, tienen un aspecto esférico y son los encargados de transportar gran variedad de proteínas hacia la membrana de los espermatozoides (Rejraji *et al.*, 2006; Girouard *et al.*, 2009). Los epididimosomas han sido descritos ya en un gran número de especies que incluyen al humano, ratón, oveja, rata, hámster y toro. Son los responsables de anclar diversos tipos de proteínas como son, P25b, factor de migración de macrófagos (MIF), aldosa reductasa (AKR1B1), entre otras, y son transferidas a regiones específicas del espermatozoide (Saez *et al.*, 2003).

I.2 Funciones del Epidídimo

I.2.1 Transporte de espermatozoides

Los espermatozoides ingresan en el epidídimo junto con fluido luminal testicular que es impulsado por las contracciones de las células miodes peritubulares, y posiblemente por el batido ciliar de las células epiteliales de los ductos eferentes. Sin embargo, en el epidídimo, el epitelio está recubierto por estereocilios inmóviles y la captación masiva del fluido que se lleva a cabo en los ductos eferentes y en el segmento inicial del epidídimo reduce drásticamente el flujo del líquido (Crabo, 1965). El transporte espermático se lleva a cabo en contra de un aumento de la presión hidrostática del testículo a la cola del epidídimo y continúa incluso cuando el flujo del fluido de los testículos se previene por una ligadura de los conductos

eferentes (Johnson y Howards, 1975). El mecanismo responsable de la conducción del fluido luminal a lo largo del túbulo epididimario se ha atribuido principalmente a las contracciones musculares de la pared de musculo liso que rodea este túbulo (Robaire *et al.*, 2006).

Diversos métodos han sido utilizados para evaluar el tiempo que tardan los espermatozoides en recorrer todo el túbulo epididimario en mamíferos, algunos de estos fueron realizados con marcadores moleculares de DNA; estas aproximaciones han permitido registrar el tiempo mínimo requerido por los espermatozoides para recorrer el túbulo epididimario. Otra manera de determinar el tiempo total de recorrido o el tiempo que tardan en recorrer cada segmento del epidídimo es, estimar la cantidad de espermatozoides de reserva y la tasa de producción diaria de espermatozoides. A pesar de algunas discrepancias entre estos métodos, parece que independientemente del tamaño del animal, su producción de espermatozoides o su reserva, el tiempo mínimo que tardan los espermatozoides en recorrer el túbulo epididimario es de 10 días (Rowley *et al.*, 1970).

En la mayoría de especies estudiadas, el tiempo promedio de tránsito de la mayor parte de espermatozoides marcados es más largo, que los que inician primero su recorrido por el epidídimo. Esto da como resultado espermatozoides de varias edades en la parte distal del epidídimo. Cuando se sigue la progresión de los espermatozoides marcados en las diferentes regiones del epidídimo el tiempo de tránsito de la cabeza y el cuerpo son bastante similares, la diferencia en el tránsito se presenta en la región caudal, en donde aparecen diferencias entre las especies

(Robaire *et al.*, 2006). Existen dos notables excepciones a los 10 días mínimos de tiempo de tránsito: en el humano y chimpancé, los primeros espermatozoides marcados que ingresan al epidídimo, logran su recorrido en 1 y 2 ± 1 día, respectivamente. Estos valores muestran que el tiempo estimado que tardan los espermatozoides en recorrer el epidídimo es entre 1 y 21 días (11 días en promedio) (Rowley *et al.*, 1970), encontrándose que el tránsito rápido se presenta en individuos que tienen una elevada producción de espermatozoides (Johnson y Varner, 1988).

I.2.2 Maduración espermática

Aunque los espermatozoides son producidos en los testículos, dependen del paso a través del epidídimo para adquirir la capacidad de fertilización (Cooper, 1999; Robaire *et al.*, 2006). La idea de que los espermatozoides de muchas especies de mamíferos recorren el túbulo epididimario alcanzando su maduración en la región del cuerpo, y siendo la región caudal donde se almacenan, surgió hace más de 70 años (citado en Amman y Schanbacher, 1983), y en la actualidad se considera que en las dos primeras regiones del epidídimo para la mayoría de mamíferos, donde ocurre la maduración espermática, culminando antes de su entrada a la región caudal.

Los diferentes tipos celulares que conforman el túbulo epididimario, propiciarán que los espermatozoides que van recorriendo el túbulo epididimario de la región cefálica hasta llegar a la cola, lleven a cabo una variedad de modificaciones, al conjunto de esos cambios se les conoce como maduración espermática (Cooper, 1999). Estos

procesos dependen de un microambiente especializado en el lumen tubular para que los espermatozoides logren su maduración (Netzel-Arnett *et al.*, 2009).

El proceso de maduración envuelve una serie de eventos bioquímicos orquestados que pueden secuencialmente modificar al espermatozoide durante su tránsito a través del túbulo epididimario (Sullivan *et al.*, 2007). Los cambios que ocurren en los espermatozoides son inducidos por la presencia de sustancias secretadas y por la eliminación de otras que son absorbidas por parte de tipos celulares particulares presentes en el epitelio epididimario (Temple-Smith, 1984; Regalado, 1992; Cooper, 1999; Robaire *et al.*, 2006). Las células epiteliales localizadas bordeando el lumen tubular, las cuales son dependientes de estimulación androgénica, secretan las proteínas que interactúan con el espermatozoide como parte de la maduración para convertirse en gametos completamente funcionales (Robaire *et al.*, 2006).

El epitelio del túbulo epididimal está compuesto predominantemente de células principales, las cuales son células secretoras de las proteínas responsables de la modificación del contenido luminal y de la superficie de la membrana del espermatozoide (Raymond y Shur, 2009). La membrana plasmática del espermatozoide está recubierta con varias macromoléculas (antígenos), cuando deja el testículo; éstas al pasar por el epidídimo pueden absorberse, alterarse o perderse y nuevas macromoléculas se integran a la membrana plasmática (Eddy *et al.*, 1985). Las principales son las glicoproteínas, carnitina y glicerofosocolina que vienen del fluido epididimario (Yanagimachi, 1988). La alteración en las características de las enzimas preexistentes permite la ganancia de nuevas proteínas de la membrana

plasmática del espermatozoide, y son mediadas por lo menos en parte, por enzimas como la galactosiltransferasa y la sialiltransferasa presentes en el fluido epididimario, como también la α -lactoalbúmina que regula la glicosilación de proteínas en la superficie del espermatozoide (Hamilton y Gould, 1980; Millete, 1999).

Se ha determinado que en la superficie de la membrana del espermatozoide existe un alto nivel de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, difosfatidilglicerol, colesterol y lípidos neutros, lo que representa el 70-80% de la composición total de la membrana (Awano *et al.*, 1993; Parks y Hammerstedt, 1985), así como un alto nivel de ácidos grasos y algunos glucolípidos, que al parecer tienen una función importante, aunque no son tan abundantes como los fosfolípidos o esteroides, sumamente importantes para el espermatozoide, pues además se ha observado que el cambio en la composición de lípidos en la membrana plasmática es una de las principales características de la maduración espermática, demostrándose que el total de lípidos en ésta célula disminuye con el paso a través del epidídimo, considerando que la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina se encuentra estable en el espermatozoide presente en las tres regiones del epidídimo y las cantidades de fosfatidilserina y fosfatidilinositol declinan significativamente al llegar a la región caudal (Parks y Hammerstedt, 1985).

La estabilización de la membrana por parte del colesterol, ya está bien establecida, a la cual se le conoce como cociente fosfolípidos-colesterol, conforme se disminuye la cantidad de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide de la región cefálica a la región caudal, se visualiza una mayor fluidez en la membrana del

espermatozoide. Durante la maduración del espermatozoide, se espera que la modificación en la composición de lípidos de la membrana plasmática sea para: 1) estabilizar la membrana durante el paso a través del epidídimo y su almacenamiento y; 2) establecer una organización molecular necesaria para la capacitación y reacción acrosomal (Parks y Hammerstedt, 1985).

La osmolaridad y la composición química del fluido luminal del epidídimo varían de un segmento a otro (D'Addario *et al.*, 1980); por lo tanto se esperaría que la membrana plasmática del espermatozoide expuesta al fluido epididimario se altere paso a paso según en el segmento que se encuentre. No hay duda que la membrana plasmática sea uno de los lugares de mayor modificación durante la maduración. Este cambio va a incrementar la habilidad de la cabeza del espermatozoide para poderse adherir a la zona pelúcida después de pasar por la cola del epidídimo.

Asimismo, la distribución de las proteínas en la membrana también cambia marcadamente entre la cola, pieza media y el acrosoma (Parks y Hammerstedt, 1985), y cuando se compara las proteínas de la membrana espermática con otros tipos celulares, los espermatozoides, probablemente exhiben el más alto grado de polaridad, reportándose entre las proteínas específicas de la membrana espermática: β -1,4 galactosiltransferasa, fucosiltransferasa, α -d-manosidasa, sp56, p95, entre otras (Millete, 1999).

Se ha observado que la composición iónica, las moléculas orgánicas y las proteínas que tienen contacto con los espermatozoides a través del epidídimo producen continuos cambios en ellos. Estos cambios están involucrados en la adquisición de: a) un marcado incremento en el vigor de la movilidad; b) el paso del movimiento circular a rectilíneo, por una mayor retención de la actividad flagelar del espermatozoide; c) el desplazamiento de la gota citoplasmática del cuello a la pieza media del flagelo; d) cambios en la carga de toda la superficie celular, resultado de modificaciones en las proteínas de la membrana plasmática; e) modificaciones en la composición lipídica del espermatozoide; y f) en algunas especies, una remodelación masiva de la forma del acrosoma (Brown y Montesano, 1980; Awano *et al.*, 1993; Cooper, 1999; Huang *et al.*, 1999; Legare *et al.*, 2001; Vernet *et al.*, 2001; Sullivan *et al.*, 2007). Tal es el caso del ratón, conejo, cerdo, cobayo, toro, carnero y humano (Fournier-Delpech *et al.*, 1979; Hinrichsen y Blaquier, 1980).

La gota citoplasmática que encontramos en un espermatozoide, se considera una estructura muy característica de un espermatozoide inmaduro, la cual, se espera haya perdido al llegar a la región caudal del epidídimo, indicativo de madurez (Temple-Smith, 1984; Cooper, 1999). Así como el acrosoma, el cual se ha descrito en algunas especies de mamíferos sufre una reducción en la longitud y ancho, conforme los espermatozoides recorren el ducto epididimario de región cefálica a caudal (Bedford, 1963; Bedford y Nicander, 1971; Overstreet y Bedford, 1974).

Muchos de los cambios moleculares que ocurren durante la maduración de los espermatozoides, involucran proteínas estructurales, receptores en la superficie de

la membrana, hormonas, citocinas, agua y canales iónicos, así como proteínas de la matriz extracelular, la actividad y disponibilidad se encuentran reguladas por proteasas (Netzel-Arnett *et al.*, 2009). El patrón de expresión genética varía a lo largo del epidídimo, secretando proteínas que codifican en el compartimento intraluminal (Sullivan *et al.*, 2007). Cuando los espermatozoides transitan por el epidídimo, una serie de proteínas del espermatozoide son proteolíticamente procesadas a su forma madura, aunque se desconocen con exactitud las proteasas involucradas en el proceso (Netzel-Arnett *et al.*, 2009).

La transferencia de un grupo específico de proteínas funcionales del epitelio epididimario al espermatozoide, sugiere que las vesículas secretadas, vía secreción apocrina, por los distintos tipos celulares, denominados como epididimosomas, están involucrados en el proceso de maduración del espermatozoide, puesto que se determinó *In Vitro*, que presentaban propiedades fusogénicas con la membrana, lo que permite el intercambio de material con el espermatozoide (Saez *et al.*, 2003; Rejraji *et al.*, 2006; Girovard *et al.*, 2009). Estas proteínas se encuentran relacionadas con la adquisición de la habilidad de unión con la zona pelúcida e interacciones con el complejo del cumulus y ovocito, así como la modulación, tanto de la movilidad de los espermatozoides en el epidídimo, también se relacionan en la protección contra el estrés oxidativo y la eliminación de espermatozoides defectuosos (Saez *et al.*, 2003; Rejraji *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2007).

En conjunto, los diversos cambios morfológicos y bioquímicos que le suceden al espermatozoide durante su paso a lo largo del túbulo en las diferentes regiones del

epidídimo, le aseguran completar su maduración en la parte distal de la región del cuerpo del epidídimo, además de permitirle al espermatozoide mantenerse funcional en la región caudal durante su almacenamiento (Parks y Hammerstedt, 1985; Cooper, 1999; Robaire et al., 2006). Así antes y después de la eyaculación, la membrana espermática sufre cambios que están asociados a la capacidad fecundante de los espermatozoides: capacitación, reacción acrosomal y fusión del espermatozoide a la superficie del ovocito (Jeyendran *et al.*, 1984).

I.2.3 Almacenamiento de espermatozoides

El mayor sitio de almacenamiento de espermatozoides en el tracto reproductor masculino de mamíferos es la región caudal del epidídimo. El tiempo normal de tránsito de espermatozoides en el epidídimo es de 3 a 10 días, aunque los espermatozoides pueden ser almacenados en ésta región por largos periodos de tiempo (Robaire *et al.*, 2006). El almacenamiento espermático es un fenómeno importante que ha sido estudiado en especies domesticas, encontrándose que los espermatozoides pueden mantenerse viables por 2 o 3 semanas (Robaire *et al.*, 2006).

En el caso de algunos murciélagos de las familias Vespertilionidae y Rhinolophidae, los espermatozoides pueden ser almacenados por varios meses en la cauda del epidídimo, manteniéndose completamente funcionales (Racey, 1979; Crichton *et al.*, 1993; Cervantes *et al.*, 2008). El fenómeno del almacenamiento prolongado de espermatozoides se consideró por mucho tiempo exclusivo de las especies que

habitaban en zonas templadas y frías que a su vez provoca una disminución de las poblaciones de insectos que son la fuente de alimento de estos murciélagos; en respuesta, estos sufren periodos largos de hipotermia adaptativa que se extendía durante toda la temporada invernal (Gustafson, 1979). Sin embargo, existen estudios en murciélagos de zonas más cálidas en los que se presenta también este fenómeno, lo cual indicaría que el almacenamiento prolongado no está relacionado con la baja temperatura ambiental (León-Galván *et al.*, 1999).

Los murciélagos que presentan el almacenamiento prolongado de espermatozoides, son estacionalmente monoéstricos, iniciando el estro y las cópulas al final del otoño y típicamente entran en un estado de letargo al comienzo del invierno, observándose una sobreposición de ambos ciclos, en mayor o menor grado. Bajo la condición de letargo, los individuos reducen drásticamente sus funciones metabólicas y temperatura corporal; lo que conlleva a una disminución de sus actividades celulares y de varias funciones centrales relacionadas a los procesos reproductores como la producción de hormonas y la capacidad de los órganos blanco para responder a la estimulación hormonal (Wimsatt, 1960).

En éste interesante fenómeno hay dos parámetros importantes que deben tomarse en cuenta; uno de ellos es precisamente el tiempo que permanecen almacenados los espermatozoides y el otro es el que mantengan sus características fundamentales (viabilidad, integridad y capacidad de realizar movimiento progresivo, así como de llevar a cabo la fertilización). Si bien, ésta adaptación se conoce ya hace más de un siglo, Pagenstecher (1859) y diversos investigadores han abordado

el tema en un esfuerzo por clarificar cómo es que los espermatozoides almacenados permanecen viables y mantienen su capacidad fertilizante por tanto tiempo, todavía a la fecha, no hay un trabajo que explique este comportamiento celular de manera contundente.

I.3 Regulación de las funciones epididimarias

Las funciones del epitelio epididimal son andrógeno-dependientes (Tekpetey *et al.*, 1989). A diferencia de la próstata y las vesículas seminales, cuyo suministro androgénico procede del torrente circulatorio y linfático, el epidídimo recibe un aporte adicional de andrógenos directamente del testículo a través del fluido testicular. Esta testosterona testicular, que se encuentra en concentraciones mucho más elevadas a las plasmáticas, se cree es importante para el mantenimiento de una completa actividad de secreción y resorción en los segmentos inicial de la cabeza del epidídimo (Toney y Danzo, 1988). Desde hace ya más de 70 años se logró determinar que la testosterona le permite al epidídimo el mantenimiento de su estructura y función (citado en Robaire *et al.*, 2006).

El principal enfoque para comprender los efectos de la ausencia de andrógenos en el epidídimo, fue la supresión del testículo, aunque de esta manera no sólo se eliminan los andrógenos, sino cualquier otro factor testicular que pueda afectar al epidídimo (Robaire y Viger, 1995; Robaire *et al.*, 2006). Después de la orquiectomía o supresión del testículo existe una disminución del peso del epidídimo, aunque no es tan marcada (Delongeeas *et al.*, 1987). La falta de testosterona impide que el

epidídimo recupere su peso a diferencia de cualquier otro órgano del tracto reproductor masculino dependiente de andrógenos, disminuye el diámetro luminal y la altura de las células epiteliales en el epidídimo, aumentando el estroma intertubular (Delongea *et al.*, 1987; Robaire y Viger, 1995). El contenido del retículo endoplásmico disminuye drásticamente, mientras que sucede una disminución en el aparato de Golgi menos pronunciada (Moore y Bedford, 1979). Los cambios morfológicos en las células principales sugieren que estas células son particularmente sensibles a diferentes niveles de andrógenos, existe una disminución del retículo endoplásmico de su citoplasma apical, presentan una pérdida de microvellosidades, así como una acumulación de lisosomas, vacuolización e incrementa la endocitosis. En contraste con otros tipos celulares que parecen no verse afectadas por la orquiectomía, esto indica que la función secretora de las células principales se encuentra comprometida con el estado suprimido de los andrógenos (Moore y Bedford, 1979; Robaire *et al.*, 2006).

Además de la dependencia del epidídimo a los andrógenos, el epidídimo también es dependiente de factores presentes en el fluido luminal originados en el testículo o del propio epidídimo. Muchos estudios han postulado que los factores provenientes del testículo son responsables del mantenimiento de la integridad y supervivencia de las células del segmento inicial del epidídimo. Este tipo de secreciones parácrinas han sido nombradas como lumícrinas, ya que ocurren dentro de un sistema ducto/tubal (Robaire *et al.*, 2006). Sin los factores del fluido testicular, muchas células del segmento inicial del epidídimo sufren apoptosis dentro de las próximas 24 horas. Por

lo que no es de sorprenderse que si se liga el epidídimo, existan cambios en la morfología y expresión de genes en el segmento inicial del epidídimo. Lo que indica que los factores que provienen del testículo sean responsables de mantener la integridad y sobrevivencia de las células del segmento inicial (Robaire y Viger, 1995; Robaire *et al.*, 2006). En el estado de supresión de andrógenos, los espermatozoides se vuelven inmóviles, pierden la capacidad de fertilizar y mueren (Robaire y Viger, 1995; Robaire *et al.*, 2006).

Los principales andrógenos que intervienen en la regulación del epidídimo son: la 5 α -reductasa, la 5 α -dihidrotestosterona y la 5 α -androstan-3 α , 17 β -diol. El mayor producto del metabolismo de la testosterona es la dihidrotestosterona (DHT), el cual es generado precisamente por la enzima 5 α -reductasa, la cual se encuentra localizada en las células principales del epidídimo (Tekpetey *et al.*, 1989; Robaire y Viger, 1995; Robaire *et al.*, 2006). Casi coincidente el descubrimiento de un segundo componente de unión a la testosterona, la proteína unidora de andrógenos (ABP), la cual facilita el transporte de la testosterona proveniente del testículo, hasta las células principales del segmento inicial del epidídimo (Robaire *et al.*, 2006).

I.4 Morfología y ultraestructura del espermatozoide epididimario

Los dos principales componentes del espermatozoide son la cabeza y el flagelo, los cuales se encuentran unidos por la pieza de unión o conexión (Figura 2) (Millete, 1999; Eddy, 2006), que a su vez se encuentran recubiertas por una estructura laminar denominada membrana plasmática, caracterizada principalmente por su

composición de lípidos y glicoproteínas, que como se menciona antes, varía dependiendo de la región del espermatozoide, además de contener una escasa cantidad de citoplasma (Millete, 1999; Eddy, 2006).

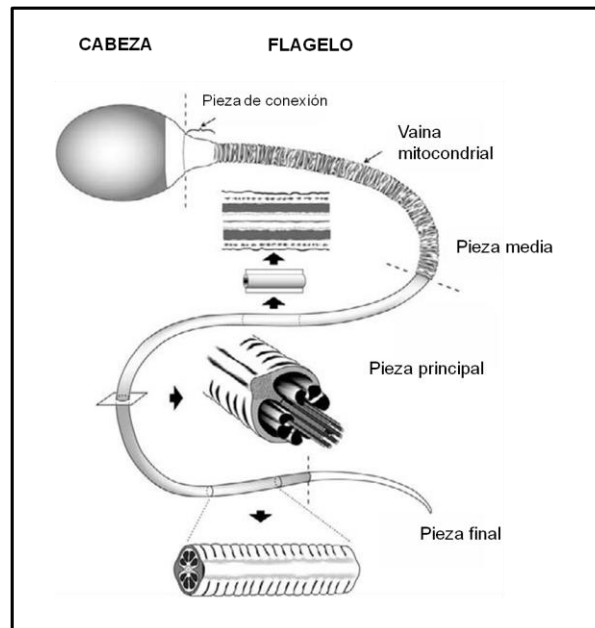


Figura 2. Estructura general del espermatozoide de mamíferos. La cabeza del espermatozoide se une al flagelo por la pieza de conexión. Las regiones del flagelo son: la pieza media, pieza principal, y pieza final (modificado de Eddy, 2006).

Los componentes característicos de la pieza de unión son el capitulum y la columna segmentada. La fosa de implantación se desarrolla con la aposición de la envoltura nuclear y el plato basal, y una densa placa de material esta adherida a la membrana nuclear externa. El interespacio entre las dos membranas que envuelven al núcleo en esta región contiene una densidad regular de 6nm de ancho y 6nm de distancia. Los filamentos finos que atraviesan la región estrecha entre el capitulum y el plato basal, se consideran los responsables de unir el capitulum del flagelo a la cabeza del espermatozoide (Eddy, 2006).

Ultraestructuralmente la cabeza se encuentra conformada por, el acrosoma, el núcleo, estructuras citoesqueléticas y una pequeña cantidad de citoplasma. El núcleo contiene una cromatina altamente condensada, y a su vez el núcleo se encuentra cubierto por el acrosoma. El flagelo, se divide en: cuello, pieza media, principal y terminal. La pieza media y principal son dos regiones que se encuentran divididas por el annulus. En el flagelo encontramos un complejo central de microtúbulos formando el axonema, rodeado por las fibras densas externas. En la pieza media encontramos la vaina mitocondrial que a su vez contiene a las mitocondrias, las cuales se encuentran arregladas en forma de hélice. La mayor parte de la longitud del flagelo se compone de la pieza principal, evidente por la fibra que envuelve al axonema. Las fibras externas densas y la vaina fibrosa son nuevas estructuras del citoesqueleto para el flagelo de espermatozoides en los vertebrados superiores y pueden haber evolucionado con la fertilización interna (Millete, 1999; Eddy, 2006). La pieza media del espermatozoide se ve modificada conforme el gameto recorre el epidídimo, debido a la migración de la gota citoplasmática de la parte anterior a posterior de la pieza media. Además de que la forma de la cabeza del espermatozoide puede cambiar, el acrosoma puede sufrir una reducción en tamaño y las proteínas de la cabeza del espermatozoide pueden migrar a otras regiones (Eddy, 2006).

Aunque en la mayoría de mamíferos presentan estas características generales, no es así en cuanto a su forma, tamaño y longitud, puesto que ya se ha determinado que son especie-específicas, generalmente se reconocen dos tipos de forma que

presentan la cabeza de los espermatozoides de mamíferos, falciforme y los que tienen forma de espátula (Figura 3) (Eddy, 2006). La longitud del espermatozoide varía de acuerdo a la especie; en humanos llegan a medir de 60-70 μm , en ratón y rata 130 y 190 μm , respectivamente, en verraco 50 μm y en toro 90 μm (Millete, 1999; Eddy, 2006; Olivera *et al.*, 2006).

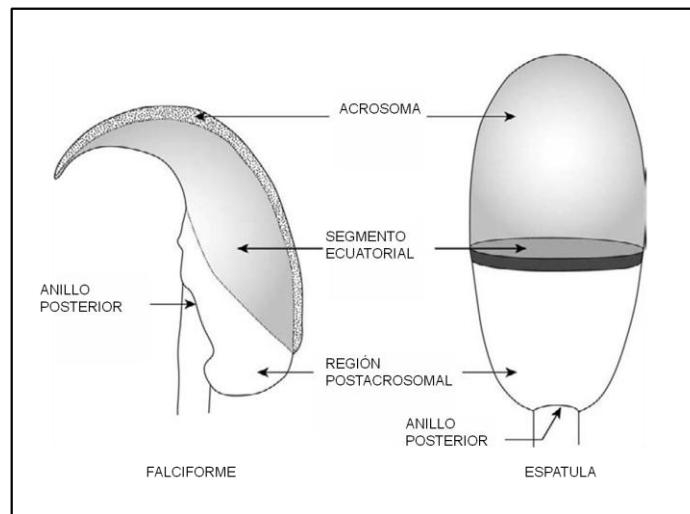


Figura 3. Características generales de la cabeza del espermatozoide de ratón (izquierda) y conejo (derecha). Las regiones más grandes de la cabeza del espermatozoide son la región acrosomal y posacrosomal. La región acrosomal del espermatozoide en forma falciforme en roedores, se encuentra relativamente antes que el acrosoma de espermatozoides en forma de espátula en el conejo. Sin embargo, el segmento ecuatorial del espermatozoide de ratón es más extenso que la región del espermatozoide de conejo (modificado de Eddy, 2006).

La membrana espermática, es una estructura heterogénea y dinámica, un ejemplo de su importancia es la composición característica de la membrana del segmento ecuatorial, que es responsable del contacto con la membrana del ovocito durante la fecundación, una vez producida la reacción acrosomal (Millete, 1999; Eddy, 2006), además de participar en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones específicas que permiten que adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Chistine,

2005). Fundamentalmente el acrosoma se ve involucrado en estos procesos, el cual contiene enzimas hidrolíticas tipo acrosina, hialuronidasa y esterases. Se considera que tiene una estructura tipo capuchón que cubre los dos primeros tercios de la cabeza del espermatozoide y está delimitado por una membrana acrosomal interna y externa (Hafez, 1989; Millete, 1999).

Las regiones más grandes de la membrana plasmática se encuentran sobre la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos, las cuales son: región acrosomal y región postacrosomal. La región acrosomal puede ser dividida a su vez en tres dominios: a) segmento marginal, b) segmento principal y c) segmento ecuatorial (Hafez, 1989; Millete, 1999; Eddy, 2006). El sitio y forma de los dominios varía de acuerdo a la especie. La región postacrosomal, incluye a la membrana plasmática entre el margen posterior del acrosoma y la pieza de unión, el margen entre la región acrosomal y postacrosomal es delimitada en algunas especies por una banda dentada o segmento ecuatorial; y la región del anillo posterior, la cual está localizada entre la cabeza del espermatozoide y la pieza de unión, la cual forma una especie de sello hermético entre los compartimentos citoplasmáticos de las dos partes principales del espermatozoide (Eddy, 2006).

La organización y composición de la membrana plasmática varía entre las diferentes regiones de la superficie de los espermatozoides, lo que da una idea de un mosaico de dominios restringidos que reflejan las especializadas funciones de la superficie y los componentes citoplásmicos de los espermatozoides (Friend, 1982). Los cambios en el contenido de lípidos y distribución en la membrana plasmática del

espermatozoide ocurren durante la maduración epididimaria y capacitación. Esto es un cambio en el cociente fosfolípidos/colesterol, el cual decrece durante la maduración epididimaria (Parks y Hammerstedt, 1985; Eddy, 2006).

El citoesqueleto subacrosomal y postacrosomal son también nombrados como teca perinuclear, este complejo cubre la superficie externa del núcleo y se encuentra formado por múltiples proteínas (Bellvé *et al.*, 1992). Esta estructura es muy prominente en la cabeza de espermatozoides con forma falciforme como la de roedores. En diversas especies incluyendo al ratón, el citoesqueleto subacrosomal del espermatozoide es conocido como perforatorium (Fawcett, 1970). Sólo que en las especies en donde la cabeza del espermatozoide tiene forma de espátula, esta estructura se encuentra en menor proporción (Oko y Clermont, 1988). El acrosoma es un único organelo del espermatozoide que se origina del Golgi y contiene enzimas necesarias para que el espermatozoide penetre al ovocito (Eddy, 2006), la forma y tamaño del acrosoma varía extensamente entre especies (Fawcett, 1970). El segmento ecuatorial forma una banda que se superpone a la línea ecuatorial de la cabeza de un espermatozoide en forma de espátula. En espermatozoides con cabeza en forma falciforme, el segmento ecuatorial puede cubrir más superficie de la cabeza, aunque en algunas especies puede no ser identificado (Eddy, 2006).

Por muchos años el estudio morfológico de los espermatozoides en mamíferos ha sido enfocado en realizar comparaciones entre diferentes especies, en la búsqueda de relaciones de parentesco, buscando determinar cuál es la especie más emparentada con la que se está estudiando (Gage, 1998; Beguelini *et al.*, 2011).

Para la mayoría de mamíferos escrotados, los estudios estructurales de los espermatozoides se han enfocado en la forma del acrosoma (Hoffer *et al.*, 1981). En algunos casos se han realizado estudios específicos por microscopía electrónica, en relación a la fertilización en quirópteros, dando aporte sobre la reacción acrosomal de espermatozoides de *Miniopterus schreibersii fuliginosus* (Mori y Uchida, 1981).

En esta investigación, se buscó realizar observaciones de estructuras particulares a nivel de microscopía electrónica en el espermatozoide de *Corynorhinus mexicanus*, que nos permitan referirnos a la maduración morfológica que sufre el espermatozoide, la cual ocurre conforme el espermatozoide transita por el epidídimo.

El papel que juega el epidídimo en la maduración de los espermatozoides de mamíferos ya no se discute, la mayor parte de los cambios que le ocurren al espermatozoide al recorrer el túbulo epididimario son de naturaleza bioquímica y fisiológica (Cooper, 1999). Los intentos por correlacionar los cambios morfológicos con regiones específicas del túbulo epididimario y la actividad de las células epiteliales, han impedido en parte, identificar los cambios sucesivos en el espermatozoide en las diferentes regiones del epidídimo. Por otra parte, los cambios morfológicos en estructuras internas de la cola de los espermatozoides no han sido reconocidas hasta la fecha, a pesar de que los cambios en los patrones de movilidad ya están bien documentados y están asociados con la maduración del espermatozoide, sin embargo, existen notables cambios a nivel del acrosoma (Hoffer *et al.*, 1981).

Para los mamíferos escrotados han sido relativamente pocas las investigaciones realizadas sobre los cambios morfológicos que sufre el espermatozoide al paso por el epidídimo. Dentro de los cambios más llamativos, se han determinado cambios morfológicos a nivel del acrosoma y del citoplasma (Hoffer *et al.*, 1981). En todos los espermatozoides de mamíferos podemos encontrar una de las estructuras más características de un espermatozoide que no ha completado su maduración, la gota citoplasmática, la cual ha permanecido como un enigma desde su descubrimiento, con especulaciones de que sus componentes membranosos representan elementos degenerados del aparato de Golgi o lisosomas (Oko *et al.*, 1993). En la cabeza del epidídimo de rata, la gota citoplásmica migra a lo largo de la pieza media hacia la cola, desde la región del cuello del espermatozoide al annulus y eventualmente se desecha cuando este pasa por la región del cuerpo del epidídimo, mientras que en la región caudal, es endocitada por las células claras del epitelio tubuar. Las células claras además endocitan diversos tipos de proteínas (Oko *et al.*, 1993; Robaire *et al.*, 2006).

II. ANTECEDENTES

II.1 Asincronía temporal de las funciones sexuales masculinas y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo en los murciélagos

En especies de mamíferos con un patrón reproductivo estacional, se puede presentar uno o dos periodos de apareamiento (bimodal), los cuales estarán sincronizados para poder tener éxito al momento de los encuentros entre machos y

hembras. Algunos murciélagos pertenecientes a las familias Vespertilionidae y Rhinolophidae muestran una asincronía temporal en el desarrollo y la función de los órganos reproductores del macho (León-Galván *et al.*, 2005). Particularmente, el desarrollo de los testículos y la espermatogénesis se llevan a cabo principalmente en el verano, mientras que el máximo desarrollo del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias, expresión de la libido y el apareamiento lo hacen en otoño (Gustafson, 1979; Krutzsch, 2009). Esta asincronía resulta en un inusual largo periodo de almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo, el cual puede extenderse por varios meses después de que los testículos han involucionado totalmente (Crichton, 2000).

En el caso del Vespertiliónido, *Corynorhinus mexicanus*, se ha estudiado el ciclo reproductivo del macho, y se ha determinado que cuenta con un patrón reproductivo temporalmente asincrónico y por lo tanto, con un almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo por un periodo de hasta 4 meses (León-Galván *et al.*, 1999). También se logró determinar que se presenta una evidente asincronía en el desarrollo de las regiones del epidídimo, la cabeza alcanza su pico de crecimiento en septiembre y la cola alcanza el máximo en octubre. La involución de la cabeza ocurre antes de la regresión de la cola. La cauda del epidídimo, se encuentra aplanada en murciélagos no reproductivos, pero hinchada y bulbosa durante otoño cuando se encuentran llenos de espermatozoides (León-Galván *et al.*, 2005).

El número de espermatozoides por cada región del epidídimo reportados por Cervantes *et al.* (2008), muestran un máximo de 30×10^6 células en las regiones

cefálica y corporal, mientras que en la cauda, se tuvieron datos de hasta 77.2×10^6 espermatozoides a principios de septiembre. La ausencia de espermatozoides fue observada en la región cefálica al inicio de octubre y en el cuerpo a finales de ese mes; mientras que en la cauda se presentó una alta concentración. Esto resulta más interesante, puesto que para estas fechas ya no hay actividad espermatogénica y por lo tanto, nuevos aportes de espermatozoides hacia el epidídimo (León-Galván, 2008). Además es importante considerar, que el epidídimo es andrógeno-dependiente y el testículo en estos quirópteros ya ha involucionado, lo que pareciera indicar también una disminución en la actividad esteroidogénica del testículo, lo cual podría tener un efecto, sobre las funciones del epidídimo que se verían reflejadas en una anómala maduración y el deterioro de los espermatozoides almacenados (León-Galván 2008), ya que se activarían procesos de apoptosis dentro del epitelio epididimario, así como la degradación de los espermatozoides (Robaire *et al.*, 2006). Sin embargo, esto no está bien esclarecido aún.

El fenómeno del almacenamiento prolongado de espermatozoides en quirópteros ha sido estudiado desde 1860, desde entonces y hasta la fecha, se han reportado alrededor de 40 especies que lo presentan (Crichton, 2000). Una de las primeras investigaciones en la que se demuestra que los espermatozoides almacenados en el epidídimo de murciélagos son capaces de fertilizar después de un largo periodo de tiempo, fue realizado por Wimsatt y Folk en los cuarentas (citado en Crichton, 2000). Interesantemente la mayoría de especies que almacenan espermatozoides pertenecen a las familias Vespertilionidae y Rhinolophidae, y viven en zonas

templadas del mundo, interrumpiendo su ciclo reproductivo por un periodo de hibernación (Racey, 1979; Crichton, 2000). Se ha registrado que los espermatozoides en el epidídimo, son almacenados por varios meses, manteniéndose viables de 4 a 10 meses (Crichton *et al.*, 1993; 1994; Cervantes *et al.*, 2008).

Durante mucho tiempo se consideró que el fenómeno del almacenamiento prolongado de espermatozoides en murciélagos, se limitaba exclusivamente a las especies que vivían en zonas templadas y frías, y que era causado por la baja temperatura ambiental, que a su vez provoca una disminución de las poblaciones de insectos que son la fuente de alimento de estos murciélagos; en respuesta, los murciélagos sufrían periodos largos de hipotermia adaptativa que se extendía durante toda la temporada invernal (Kruttsch, 1979; Jolly y Blackshaw, 1987). Sin bien existen estudios en murciélagos de zonas más cálidas en los que se presenta también este fenómeno, lo cual indicaría que el almacenamiento prolongado no está relacionado con la baja temperatura ambiental (Kruttsch, 2009), es importante mencionar que las especies reportadas, en realidad sí viven en ambientes templados, debido a la elevada altitud geográfica en que se distribuyen. Actualmente, se tienen reportes con mayor sustento que señalan que la regulación del mantenimiento estructural y funcional de los espermatozoides durante el prolongado periodo de almacenamiento se debe a aspectos morfofisiológicos de los espermatozoides en relación con el ambiente epididimario (Crichton *et al.*, 1993,1994).

Una de las propuestas que han intentado explicar por qué los espermatozoides de murciélagos hibernantes permanecen íntegros estructural y funcionalmente por un largo periodo de tiempo en la cauda del epidídimo, fue planteada por Crichton *et al.* (1994), como la condición que propiciara probablemente cierto grado de deshidratación de los espermatozoides y por lo tanto, su inmovilización; con ello, la quiescencia celular por reducción de la respiración, conservando su energía y preservándose de esta manera su viabilidad al prevenir el inicio del movimiento progresivo en el espermatozoide. Esto debido a que las paredes del epidídimo se encuentran especializadas para soportar la presión osmótica del contenido luminal, ya que como se noto, las células epiteliales del epidídimo de *Antrozous pallidus* presentan conformación progresiva de uniones estrechas durante la hibernación, apareciendo a manera de ramificaciones entretejidas como hilos que forman una especie de malla, que varía en forma y tamaño dentro del órgano, propiciando que se genere una elevada osmolaridad (Chrichton *et al.*, 1993). Pero el efecto del ambiente hiperosmolar sobre la fisiología del espermatozoide aún debe ser probada con más estudios.

Posteriormente se realizó una investigación por parte del mismo grupo de investigadores en donde se menciona que la membrana plasmática de los espermatozoides del murciélago vespertilionido *Myotis velifer* al parecer presentaba mayor resistencia a factores que se conoce eran desestabilizadores para la membrana de los espermatozoides de otros mamíferos; como detergentes, al término de los experimentos, se determinó que no existía ninguna diferencia en

cuanto a la resistencia membranal a los agentes probados. Por lo que no se podía atribuir que la larga sobrevivencia espermática se debiera a una alta resistencia de la membrana plasmática (Chrichton *et al.*, 1993).

Wang *et al.* (2008), realizaron un estudio en el murciélago *Myotis ricketti*, en donde se describe la morfología del epidídimo durante el periodo de hibernación y almacenamiento espermático, encontrándose que el epidídimo se observa distendido a simple vista, por examinación externa. Durante el periodo de almacenamiento de espermatozoides, la cauda del epidídimo se encontró con espermatozoides desde septiembre y hasta abril, con alrededor de 1.9×10^8 de espermatozoides en el par de epidídimos de esta especie, lo que indica un almacenamiento de 6.5 meses aproximadamente, y observándose vacío los meses restantes. Lo que indica que el almacenamiento espermático en *M. ricketti* es relativamente más largo comparado con lo reportado para otras especies de mamíferos.

Krutzsch (2009), realizó una descripción morfológica del testículo y epidídimo de *Myotis velifer*, en donde se pudo observar que cuando inicia el periodo reproductivo, los espermatozoides son mucho más abundantes en la región cefálica, pasando de ahí al corpus y llegando a la cauda, ocasionando un evidentemente aumento en su tamaño, manteniendo un gran número de espermatozoides útiles hasta la primavera siguiente. En una ocasión encontraron un individuo en mayo todavía con espermatozoides dispersos en el epidídimo, lo que indica un almacenamiento de 8.5 meses. El estudio de microscopía electrónica indicó que los espermatozoides no se

encontraban orientados hacia el epitelio del epidídimo, pero se encuentran en mayor frecuencia aglutinados en la luz del túbulo, y no es raro observar que se encuentren alineados horizontalmente respecto al epitelio epididimario.

II.2 La maduración y el almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*

El fenómeno de la maduración en mamíferos ha sido estudiado desde hace ya varios años, dejando por entendido que en las primeras dos regiones del epidídimo es donde concluye dicho fenómeno, y siendo la región caudal sólo donde se llevará a cabo el almacenamiento de espermatozoides (Amann y Schanbacher, 1983, Cooper, 1999), que en el caso particular de *C. mexicanus*, se extiende por 5 meses aproximadamente en la cauda del epidídimo (León-Galván, 2005). Como bien ya se ha mencionado, existen trabajos que buscan determinar qué es lo que le confiere a los espermatozoides mantenerse viables por largos periodos de tiempo sin perder su capacidad de fertilización. Sin embargo, sólo un trabajo menciona que el largo periodo de almacenamiento de espermatozoides se encuentra relacionado con el proceso de maduración (Cervantes *et al.*, 2008).

Las investigaciones realizadas hasta la fecha en *C. mexicanus* buscan esclarecer que es lo que está pasando cuando el espermatozoide transita por el epidídimo de este animal, hasta llegar a la región caudal. Se han realizado estudios sobre la participación de las enzimas antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, midiendo su actividad enzimática que se encuentra en el

epidídimo de *C. mexicanus*, cómo mecanismo para modular a las especies reactivas de oxígeno (ERO), durante la maduración y el almacenamiento prolongado de espermatozoides, en donde se presentan dos patrones de actividad enzimática, de acuerdo a la fase del ciclo reproductivo epididimario. La actividad de la catalasa en el epidídimo durante todo el ciclo reproductivo es particularmente alta. La actividad de la superóxido dismutasa está presente durante el tránsito de los espermatozoides que van del testículo al epidídimo y durante la maduración de los espermatozoides, pero está casi completamente ausente entre la región cefálica y la región caudal del epidídimo durante el periodo de almacenamiento epididimal (Arena-Ríos, *et al.*, 2005). Por otra parte, la actividad de la glutatión peroxidasa es baja durante la fase testicular de espermatozoides y alta entre segmentos del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) durante la maduración (Arena-Ríos, *et al.*, 2005).

Se concluyó que para el fluido epididimario se presenta una importante actividad de las enzimas (SOD, CAT, GPX); no presenta cambios la CAT y GPX, y sí un aumento en la actividad de la SOD en septiembre cuando hay presencia de espermatozoides en el epidídimo (Arenas-Ríos *et al.*, 2005). Consecutivamente se demostró que el equilibrio redox de los microambientes en el epidídimo está asociado a los entornos por los cuales los espermatozoides de estos mamíferos deben progresar durante su tránsito a través del epidídimo. Esto parece estar específicamente controlado y diferenciado con relación a la compartimentalización de las funciones del epidídimo (Arenas-Ríos *et al.*, 2009).

En algunas de estas investigaciones se ha indicado que se puede estar presentando una maduración espermática tardía (principal función del epidídimo) (Cervantes *et al.*, 2008). León-Galván *et al.* (1999), indican la presencia de gran cantidad de espermatozoides en la región caudal del epidídimo a partir de Noviembre (90.3×10^6), con un evidente decremento hacia enero (25.3×10^6). Para tener un mejor entendimiento de lo que estaba sucediendo en el paso a través del tracto genital masculino, Cervantes *et al.* (2008), realizaron una investigación en la cual tomaron por separado las tres regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), determinando la presencia de gota citoplásmica en los espermatozoides y su capacidad de llevar a cabo la capacitación y reacción acrosomal, como evidencia de maduración, encontrando que el paso de los espermatozoides de *C. mexicanus* a través del epidídimo es rápido, y que, la región de la cola no simplemente es un reservorio para ellos como se conoce para la mayoría de las especies de mamíferos (Holland *et al.*, 1992), sino que en esta especie, es en esta región donde se completa la maduración espermática y que parece ser independiente de la función del testículo (Cervantes *et al.*, 2008).

En la región caudal del epidídimo, el número de espermatozoides que presentan gota citoplasmática fue alta en septiembre (19.7%), con un decremento constante, registrándose valores muy bajos a finales de octubre (1.7%). Los valores mostrados de capacitación al inicio de Septiembre son del 6% en el caso del cuerpo y 16% en la región caudal, aumentando en octubre hasta 19.4% y 33.2% respectivamente. Para las mismas fechas, en el caso de la reacción acrosomal se obtuvieron valores

de 7.6% para el cuerpo y 12.0% para la cola, aumentando hasta 22.2% y 32.3% respectivamente. Estos datos fueron indicativos de que la maduración de los espermatozoides continuó en la región caudal del epidídimo.

El estudio del fenómeno de la maduración y almacenamiento espermático, ha sido abordado desde muchos puntos de vista, bioquímicos, anatómicos e histológicos, por lo que es de gran interés para nuestro grupo de investigación, determinar las características particulares del epidídimo, que apoyen la información acerca de la maduración y almacenamiento en una especie de murciélago estacional como es *Corynorhinus mexicanus*.

III. HIPÓTESIS

Las características histológicas presentes en el túbulo epididimario y en el espermatozoide de *Corynorhinus mexicanus* darán sustento de que el proceso de maduración epididimaria de espermatozoides termina en la región caudal del epidídimo de éste quiróptero.

IV. JUSTIFICACIÓN

En el murciélago Vespertiliónido *Corynorhinus mexicanus* se ha sugerido, que el proceso de maduración espermática requiere un tiempo inusualmente más largo en comparación con el reportado para el resto de los mamíferos, y que además, es completado en la región caudal del epidídimo. La gran cantidad de gota citoplasmática presente en espermatozoides a nivel caudal es una de las evidencias que se tiene acerca de éste fenómeno tan particular, así como la baja capacidad

fertilizante y poca reacción acrosomal que pudieran adquirir en condiciones *in vitro* al inicio del periodo reproductivo. Hacen falta más evidencias que reafirmen que el proceso de maduración espermática sucede al tiempo en que los espermatozoides son almacenados por largos periodos de tiempo en la cauda del epidídimo de este quiróptero. La realización de un estudio histológico nos permite tener una evidencia más certera de cómo se comporta el epitelio epididimario conforme transcurre el periodo reproductivo y de cómo las diferentes regiones del epidídimo se encuentran desfasadas unas de la otras; corroborado con un buen análisis morfométrico del túbulo epididimario y una detallada caracterización ultraestructural del espermatozoide de *C. mexicanus*. Puesto que hasta el momento se considera que la maduración en mamíferos termina en la región corporal del epididimo, estas evidencias nos brindan un mejor entendimiento del proceso maduracional ocurrido en una especie estacional que mantiene un largo periodo de almacenamiento.

V. OBJETIVO GENERAL

- Analizar histológicamente el epidídimo de murciélagos *Corynorhinus mexicanus* capturados a lo largo de un ciclo reproductivo anual, para determinar la relación que existe entre el epidídimo con la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides en esta especie.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar histológicamente las tres regiones anatómicas del epidídimo (caput, corpus y cauda) de murciélagos adultos y reconocer sus variaciones

temporales en las principales etapas del ciclo reproductivo de la especie para establecer la participación de cada región epididimaria en el proceso de maduración de los espermatozoides.

- Analizar las características morfológicas y ultraestructurales de los espermatozoides de *C. mexicanus* para reconocer estructuras que permitan establecer diferencias entre células maduras e inmaduras.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Obtención de los murciélagos de estudio

A partir de Junio de 2010 a febrero de 2011. Un total de 10 murciélagos fueron capturados en la localidad conocida como “El túnel” ubicada a 10 Kilómetros al este de Tlaxco, Tlaxcala a 3320 msnm. Las capturas se realizaron en cinco diferentes periodos del año, que representaron las principales etapas del ciclo reproductivo: 1- De febrero a mayo (fase inactiva); 2- De junio y julio (Reinicio de la actividad reproductiva); 3- A fines de agosto y principio de septiembre (fase inicial de la maduración y almacenamiento espermático epididimario); 4- octubre (Maduración); 5- diciembre (temporada de apareamientos). Para cada una de las cinco fechas indicadas se contó con dos ejemplares sexualmente maduros, mismos que conformaron los grupos de estudio. Las características de adultez que se tomaron en cuenta fueron, el completo cierre de las epífisis metacarpo-falangeal del tercer dedo de la mano; y para el epidídimo, que se encuentre: alargado, bulboso, y con una coloración clara (León-Galván *et al.*, 2005).

VII.2 Obtención y procesamiento de los epidídimos y espermatozoides

Los animales seleccionados fueron transportados vivos al laboratorio donde se sacrificaron por decapitación. Inmediatamente después se disecaron ambos epidídimos; uno de ellos fue separado en sus tres regiones (caput, corpus y cauda) para la obtención de espermatozoides, y el otro fue procesado histológicamente. Y para contar con una evidencia histológica más de la maduración en esta especie, se realizó la descripción morfológica de los espermatozoides epididimarios de *Corynorhinus mexicanus*,

VII.2.1 Preparación para microscopia de luz transmitida

La región caudal del epidídimo fue depositada en una caja de Petri donde se picaron con tijeras, utilizando 500 µl de medio Ringer a 34°C, la suspensión resultante, se filtró haciéndola pasar a través de una malla de lycra (98% Nylon/Poliamida, 2% lycra/Elastano), con un diámetro de trama de 20 µm; enjuagándose nuevamente con otros 500µl de Ringer, para separar a los espermatozoides del tejido epididimario (León-Galván *et al.*, 1999). Los espermatozoides en suspensión fueron lavados dos veces por centrifugación a 500 X g, por 5 minutos, y resuspendidos finalmente con un mililitro de medio Ringer.

VII.2.2 Morfometría de espermatozoides

Se realizó mediante la técnica de tinción con Eosina-Nigrosina (Anexo I). Los espermatozoides se observaron en el microscopio de campo claro Leica DMLS. Tomando como principales medidas: Longitud total del espermatozoide, longitud de

la cabeza, ancho de la cabeza y longitud del flagelo (Figura 4). Las fotografías fueron tomadas con el programa de adquisición de imágenes DC-Viewer de Leica, las mediciones fueron hechas en el programa IM-1000 de Leica.

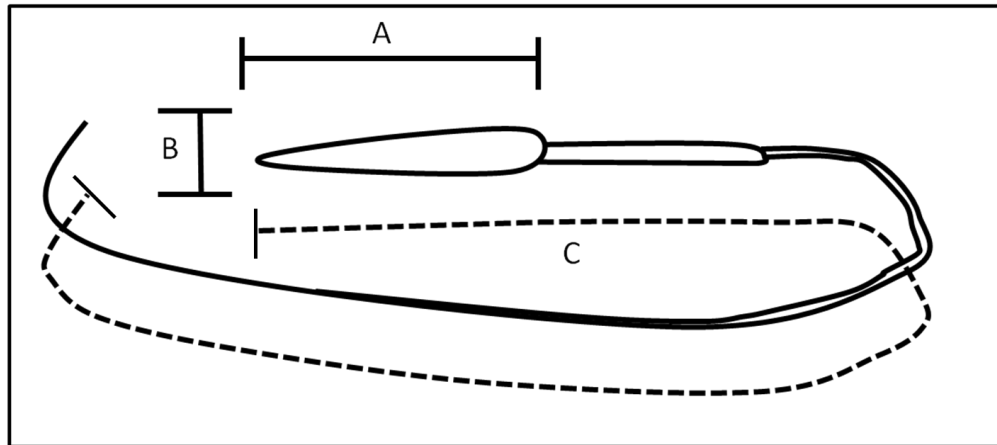


Figura 4. Esquema representativo de las principales medidas tomadas en el espermatozoide de *C. mexicanus*: longitud total del espermatozoide (C), longitud de la cabeza (A), ancho de la cabeza (B) y longitud del flagelo (A - C).

VII.2.3 Histología y morfometría del túbulo epididimario

La histología de los epidídimos se realizó mediante dos técnicas.

Histología convencional: Fijación, formol (3-4%); deshidratación, alcohol etílico; inclusión, parafina; seccionados a 8μ de grosor en un micrótopo de rotación; tinción, Hematoxilina-Eosina (Anexo I) (Reynolds, 1999).

Microscopia electrónica: Fijación en Karnovsky, sumergidos posteriormente en el mismo fijador por 4h, lavados con solución amortiguadora de cacodilatos 0.1 M; posfijados en tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en buffer de Zetterqvist (Hopwoud y Milhe,1991); inclusión, EPON (Smith y Croft, 1991); corte $1\mu m$ de grosor en un

ultramicrotomo; tinción, azul de toluidina al 0.5% (Hayat, 1993). Los tejidos fueron cubiertos con Entellan y observados en el microscopio de campo claro Leica DMLS.

Para determinar la distribución de los diferentes tipos celulares presentes en el túbulo epididimario, se tomaron fotografías del tejido, con el programa de adquisición de imágenes DC-Viewer de Leica. Las mediciones del área total del túbulo epididimario, área de la luz del túbulo y área del tejido epitelial epididimario, fueron hechas en el programa IM-1000 de Leica.

VII.2.4 Preparación para microscopía electrónica de barrido y de transmisión

Barrido: Fijación con glutaraldehído 6%; deshidratación con series graduales de alcohol etílico; para la desecación al punto crítico se utilizó el equipo Sandri-795; montaje y recubrimiento con oro (Denton vacumm LLC) (Bozzola y Russell, 1992). La toma de imágenes se realizó con el microscopio electrónico de barrido Jeol Jm 5900 Iv.

Transmisión: Fijación con Karnovsky; posfijación con tetróxido de osmio al 1%; deshidratación en series graduales de alcohol etílico; inclusión en EPON; corte 1 μm , 200 nm; tinción de contraste con acetato de uranio y citrato de plomo (Bozzola y Russell, 1992).

VII.3 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos, se tomaron como grupos, el área total del túbulo, área de la luz del túbulo y área del tejido epitelial, para cada una de las cinco diferentes

fechas que abarcan el ciclo reproductivo (inactividad, reinicio, preparación, maduración y apareamiento), así como las tres regiones del epidídimo, comparando éstas entre fechas y regiones. Para cada variable se realizó las determinaciones por duplicado y se tomó la mediana de éstas dentro de cada grupo de estudio, con una $n=12$. Las comparaciones entre los grupos de datos se analizaron mediante la prueba “Z” de Kruskal-Wallis, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas, considerando para ello una $p<0.05$ (Sokal y Rohlf, 1995).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 Descripción morfológica del epidídimo y relación con su función en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

VIII.1.1 Características anatómicas e histológicas

En el epidídimo de *C. mexicanus* se pudieron reconocer las tres principales regiones anatómicas (caput corpus y cauda) (figura 5), encontrándose que en el mes de diciembre, parte final de los apareamientos en estos murciélagos, la parte anterior de la región cefálica del epidídimo es más robusta o gruesa que el cuerpo del epidídimo, en donde se puede apreciar un adelgazamiento del túbulo epididimario, donde claramente se observa que no es tan robusta como el caput o cauda del epidídimo, haciendo una especie de embudo y descendiendo de manera menos convoluta. Esto ayuda a comprender lo reportado por Cervantes *et al.* (2008), en donde se menciona que el tránsito de los espermatozoides al parecer es rápido;

además de reportar un alto porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática para la región caudal, lo que indica que no han completado su maduración.

En el epidídimo de *C. mexicanus* se pudo observar claramente cómo las tres regiones del epidídimo van cambiando conforme avanza el ciclo epididimario, cambiando en tamaño en relación a la presencia o ausencia de espermatozoides, de acuerdo a la fecha del ciclo anual, por ejemplo, se encuentra delgado y largo en las fechas que no hay evidencia de espermatozoides en ninguna de las tres regiones del túbulo, lo cual concuerda con lo reportado por Wang *et al.* (2008), en donde se menciona que el epidídimo en las fechas en las cuales no hay presencia de espermatozoides se encuentra completamente distendido a simple vista. Como se observa en la figura 5, debido a la presencia de espermatozoides que ingresan a la región cefálica del epidídimo, ésta aumenta en tamaño, sucesivamente conforme los espermatozoides recorren el túbulo epididimario, pasando al cuerpo y posteriormente a la región caudal, las regiones anteriores se van quedando sin espermatozoides. Así hasta su almacenamiento en la región caudal, en donde esta región adquirirá una forma parecida a un saco, como lo descrito por León-Galván *et al.* (1999) y Krutzsch (2009), donde los murciélagos machos adultos al presentar gran cantidad de espermatozoides en la región caudal se observa bulbosa.

La región caudal del epidídimo va aumentando gradualmente de tamaño, de la parte anterior que se une con el cuerpo, hasta la parte distal. Anteriores reportes (Hermo *et al.*, 1992; Cooper, 1999; Robaire *et al.*, 2006; Setchell y Breed, 2006), han descrito para la generalidad de mamíferos, que se distinguen claramente las mismas

tres regiones anatómicas que se distinguen en *C. mexicanus*, manteniéndose también las mismas características, una cabeza más robusta, puesto que recibe la llegada de los espermatozoides, un cuerpo mucho más estrecho y una región caudal globosa, ya que es ahí donde se almacenaran los espermatozoides. Si bien las características anatómicas son similares, la dinámica del proceso de maduración no pareciera llevarse a cabo como en la generalidad de los mamíferos. La maduración de los espermatozoides finaliza al llegar a la parte distal del cuerpo del epidídimo, siendo la región caudal solamente un reservorio para los espermatozoides (Cooper, 1999). Pero en esta especie de quiróptero podemos observar (figura 5) que las dos primeras regiones del epidídimo quedan completamente vacías en el mes de septiembre, sin presencia de espermatozoides, y un mes después la región caudal del epidídimo se encuentra completamente llena, continuando con un largo periodo de almacenamiento.

Cada región del epidídimo está organizada en lóbulos separados por septos de tejido conectivo que en parte sirven de soporte interno, se han propuesto para separación funcional entre lóbulos que permiten la expresión selectiva de genes y proteínas en las células epiteliales del túbulo dentro de esos lóbulos individuales (Turner *et al.*, 2003). En la región cefálica del epidídimo de *C. mexicanus*, es notoria la cantidad de septos presentes (figura 6), ya en la región del cuerpo se reducen evidentemente el número de septos conforme se une a la región caudal del epidídimo. Si bien es sabido que los septos del epidídimo brindan soporte y estabilidad al epidídimo, además de que las paredes del epidídimo se encuentran

especializadas para soportar la presión osmótica del contenido luminal, si consideramos que es en la cabeza y cuerpo del epidídimo en donde se lleva a cabo la maduración del espermatozoide, esto indica, como lo menciona Turner *et al.* (2003), que es necesario que se genere el microambiente ideal para llevar a cabo dicho proceso, y los espermatozoides maduren, lo cual involucra también la gran convolución presente en el epidídimo de este mamífero, principalmente en esta región. A nivel de la región caudal del epidídimo, como se ha descrito por Chrichton *et al.* (1993), la presencia de uniones estrechas en el epidídimo de algunas especies de murciélagos, propicia el incremento en la osmolaridad del túbulo epididimario, lo cual genera que los espermatozoides entren en un estado de quiescencia durante el periodo en que serán almacenados hasta su posterior eyaculación.

En la región caudal del epidídimo de este murciélago, no se lograron observar septos claramente distinguibles, aunque sí un gran aumento en el tamaño y capacidad de almacenamiento, hay que tomar en cuenta que la actividad espermatogénica en esta especie, ocurre de mayo a mediados de octubre, siendo los espermatozoides liberados del testículo a finales de agosto; y conforme pasen los espermatozoides por las diferentes regiones epididimarias hasta llegar a la región caudal. Esta región debe tener una buena resistencia para soportar el volumen adecuado de espermatozoides hasta el momento de los apareamientos, además que es una de las funciones que se le atribuye a esta región, de acuerdo a lo que mencionan varios autores (Cooper, 1999; Holland *et al.*, 1992; Robaire *et al.*, 2006). Se observa una gran convolución del túbulo epididimario desde la parte inicial que

continúa hasta la parte final de la cola, además de que a esta especie se le atribuye que la maduración del espermatozoide termina en la región caudal, de acuerdo con lo reportado por Cervantes *et al.* (2008). A pesar de que los septos de tejido conectivo no son muy evidentes en la región caudal de *C. mexicanus*, diversos autores (Turner *et al.*, 2003; Robaire *et al.*, 2006), han mencionado que se encuentran presentes a lo largo del ducto epididimario. Puesto que se ha establecido que los septos de tejido conectivo, se encuentran relacionados con el proceso de maduración, para generar el microambiente adecuado para que los espermatozoides que transitan por el epidídimo puedan incrementar su movilidad y adquirir su capacidad fertilizante (Turner *et al.*, 2003; Robaire *et al.*, 2006), también están involucrados en el mantenimiento y viabilidad de los espermatozoides que se encuentran almacenados en la región caudal del epidídimo de este murciélago. Esto concuerda en que desde el momento en que el epidídimo se mantiene de forma globosa a partir de septiembre, inicio del proceso maduracional, y hasta el momento en que llegan los apareamientos (diciembre), permitiendo una inseminación en sincronía al momento de la ovulación en hembras, lo que es similar en estudios realizados por Jolly y Blackshaw (1987) y León-Galván *et al.* (2005).

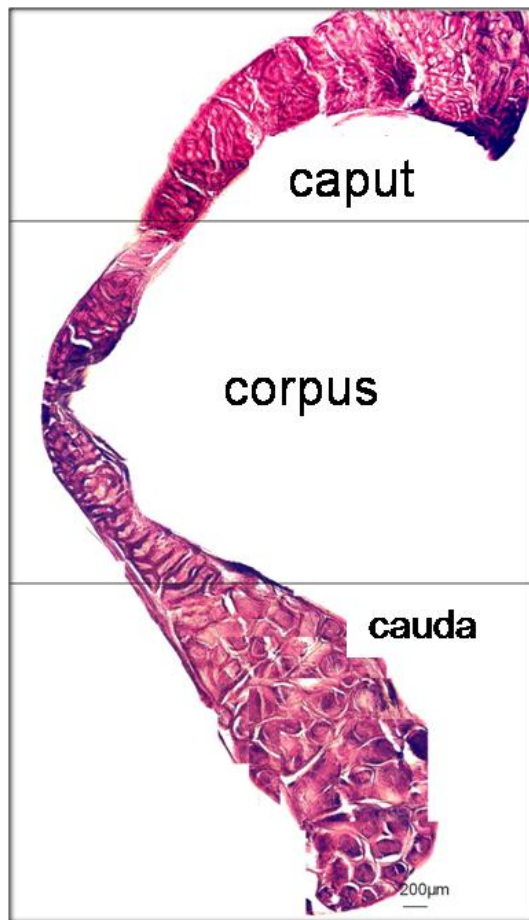


Figura 5. Composición de fotomicrografías del epidídimo de *C. mexicanus* en sección longitudinal, donde se puede reconocer las 3 regiones anatómicas (Caput, Corpus y Cauda)

En el ciclo epididimario de *C. mexicanus* se puede observar claramente de acuerdo a sus características histológicas como en el mes de febrero, no hay presencia de espermatozoides en ninguna de sus tres regiones, evidencia de una fase inactiva por parte del túbulo epididimario. En el mes de junio se reactiva el ciclo, pudiéndose observar que anatómicamente la cabeza del epidídimo es menor en tamaño que la cola. Al inicio de la fase de maduración se encuentran espermatozoides en las tres regiones del epidídimo, siendo mayor la cola en tamaño y manteniéndose así hasta llegar a la fase de apareamiento. Sin duda ya no hay presencia de espermatozoides

en la región cefálica y corporal en esta misma fecha, lo cual indica un clara asincronía entre la región caudal y la cabeza, aproximadamente de un mes (figura 5).

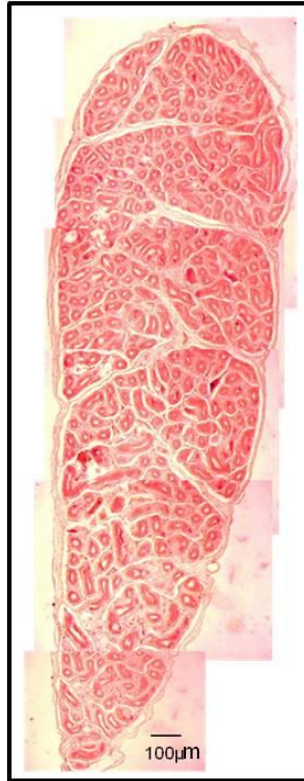


Figura 6. Composición de fotomicrográficas de la región cefálica del epidídimo de *C. mexicanus* en sección longitudinal, donde se puede apreciar la gran cantidad de septos de tejido conectivo (STC).

La histología muestra que existe involución de la cabeza del epidídimo un mes antes de la regresión de la cola, lo cual confirma lo reportado por León-Galván *et al.* (2005). No hay presencia de espermatozoides en febrero en la región caudal del epidídimo, lo que evidencia que no hay participación del epidídimo en esa época, lo que también corresponde con lo presentado por León-Galván *et al.* (1999, 2005). Esto indica una evidente asincronía entre regiones del epidídimo, la cabeza alcanza su máximo pico de crecimiento en septiembre, la cola alcanza el máximo en octubre

manteniéndose hasta el momento de los encuentros entre machos y hembras. Esto demuestra un evidente largo periodo de almacenamiento, que a su vez al parecer está asociado con una lenta maduración de espermatozoides, de acuerdo con lo reportado por Cervantes *et al.* (2008).

En la mayoría de especies de mamíferos se ha encontrado la presencia de células principales, las cuales son persistentes a lo largo del túbulo epididimario, están asociadas al proceso de maduración de los espermatozoides, ya que estas células se distinguen por su maquinaria endocítica y secretoria muy desarrolladas, además de que presentan diferencias estructurales y funcionales en cada región del epidídimo (Hermo y Robaire, 2002; Robaire *et al.*, 2006). En el caso del epidídimo de *C. mexicanus*, sucede lo mismo, las células principales se encuentran presentes a lo largo de las tres regiones epididimarias. En el mes de febrero se lograron encontrar tres tipos celulares, incluyendo las células principales a lo largo del epidídimo, células apicales en la región del cuerpo y células claras en la región caudal (figura 8). En este mes ya no hay presencia de espermatozoides en ninguna de las tres regiones del epidídimo, como se muestra en la figura 7, además de que el periodo de almacenamiento termina en el mes de enero, de acuerdo con lo reportado por León-Galván *et al.* (2005), por lo que la presencia de células principales y claras, sin que se evidencie la formación de vesículas o endosomas a todo lo largo del epidídimo es de esperarse, ya que no se necesita de una gran síntesis o endocitosis de sustancias, debido a la ausencia de espermatozoides.

El que se hayan encontrado células principales asociadas con células apicales en el túbulo de la región del cuerpo del epidídimo de *C. mexicanus*, podría indicar una adecuación del lumen del túbulo epididimario, puesto que están involucrados con la modificación del ambiente luminal, según lo reportado por Adamali y Hermo (1996) y Andonian y Hermo (1999). Si se coincide que los espermatozoides serán almacenados por varios meses en la cauda del epidídimo se necesita generar el ambiente adecuado para mantenerlos viables, es por ello que se necesitan tipos celulares especializados en proporcionar las condiciones adecuadas en el lumen epididimario. Además, hay que tener en cuenta que después de este periodo tan largo de almacenamiento de espermatozoides que abarca un poco más de cuatro meses, debe existir un adecuado mecanismo de restauración del lumen del túbulo epididimario, para poder brindar nuevamente el ambiente necesario para la recepción de espermatozoides al inicio de un nuevo ciclo epididimario, el cual al parecer es brindado por las células apicales.

Para el mes de septiembre, particularmente en la región cefálica, se presentó el mayor número de tipos celulares, como células claras, basales, halo y estrechas (figura 9). En la región del cuerpo sólo se encontraron células basales y principales (figura 10), y por último, en la región caudal se determinaron células basales, claras, halo y principales (figura 10). En octubre se aprecian tres tipos celulares (apicales, basales y principales) (figura 11), sólo que la primera de ellas, sólo se encontró en el cuerpo y ausente en la cola (figura 11), no encontrándose más que células basales y principales en el mes de diciembre (figura 12).

Como se puede apreciar en las figuras (9 y 10), es evidente una diferenciación estructural en cada región, ya que las células principales que se ven en la región cefálica, se ven íntegras en toda su estructura, conservando en su totalidad el citoplasma y los núcleos claramente alineados hacia la base. Sin embargo, conforme se recorren las diferentes regiones, se observa que las células principales que se encuentran en la región caudal, presentan una evidente diferenciación dentro de su citoplasma, puesto que se aprecia la formación de vesículas, evidencias de sus gránulos secretorios (tal vez de epididimosomas), como lo mencionan Hermo y Robaire (2002), quienes muestran diferencias morfológicas de las células principales de las diferentes regiones del epidídimo, siendo que las células epiteliales del túbulo de la región cefálica y corporal, conservan todo su citoplasma, a diferencia de las células principales de la región caudal, las cuales, pareciera que existen huecos en sus citoplasma por la formación de vesículas, las cuales se relacionan con el proceso de maduración de los espermatozoides; estos cambios se reflejan en el aparato de Golgi, gránulos secretorios y aparato endocítico (vesículas, endosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas).

Es fundamental que la región cefálica del epidídimo de *C. mexicanus* presente células estrechas, ya que como lo mencionan Adamali y Hermo (1996); Serre y Robaire (1998); Andonian y Hermo (1999); Robaire *et al.* (2006), para otras especies de mamíferos, además de participar como células endocíticas, son necesarias para poder generar células claras. En el epidídimo de *C. mexicanus* se encontraron como en la mayoría de mamíferos, células basales, aquí no se logró visualizar, por el tipo

de técnica utilizada, que tuvieran contacto con el lumen del túbulo epididimario (Olson *et al.*, 1995; Robaire *et al.*, 2006). Las células basales presentes en la región caudal del epidídimo de *C. mexicanus* se consideran indispensables de acuerdo a su función. Puesto que los espermatozoides de *C. mexicanus* se almacenarán por un largo periodo de tiempo, existirá un gran consumo de oxígeno por parte de los espermatozoides y un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno, de acuerdo con Yeung *et al.* (1994), las células basales brindan protección contra especies reactivas de oxígeno, este tipo celular ayudará con la regulación en la concentración de este tipo de moléculas, además de participar en los procesos de maduración y almacenamiento espermático.

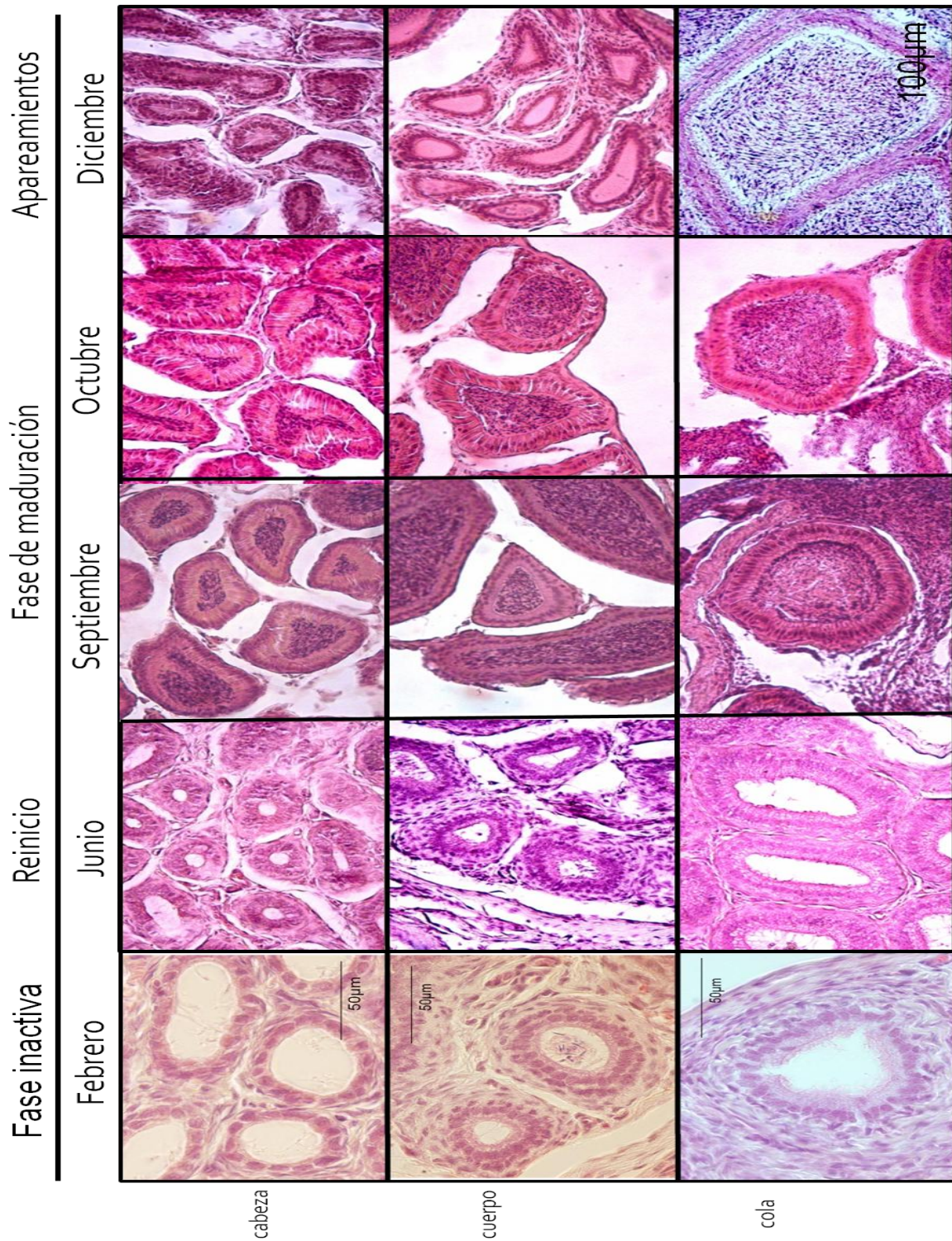


Fig. 7. Fotomicrografías de las tres regiones del epidídimo del murciélago *C. mexicanus*, obtenidas en etapas representativas del ciclo epididimario, fase inactiva (febrero), reinicio (junio), fase de maduración (septiembre-octubre), apareamientos (diciembre).

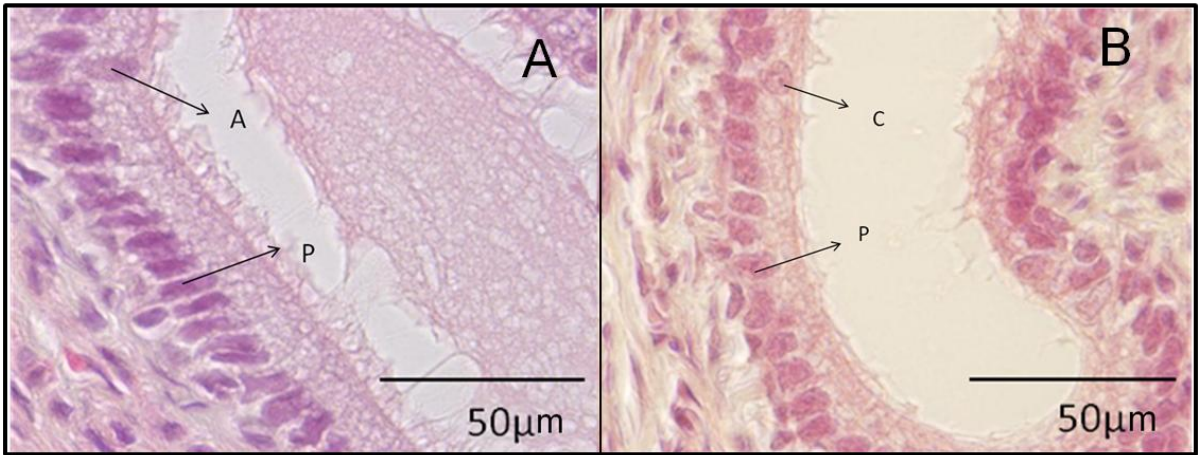


Figura 8. Fotomicrografías del túbulo epididimario de la región del cuerpo (A) y cola (B) del epidídimo de *C. mexicanus*, febrero. A= célula apical; C= célula clara P= célula principal.

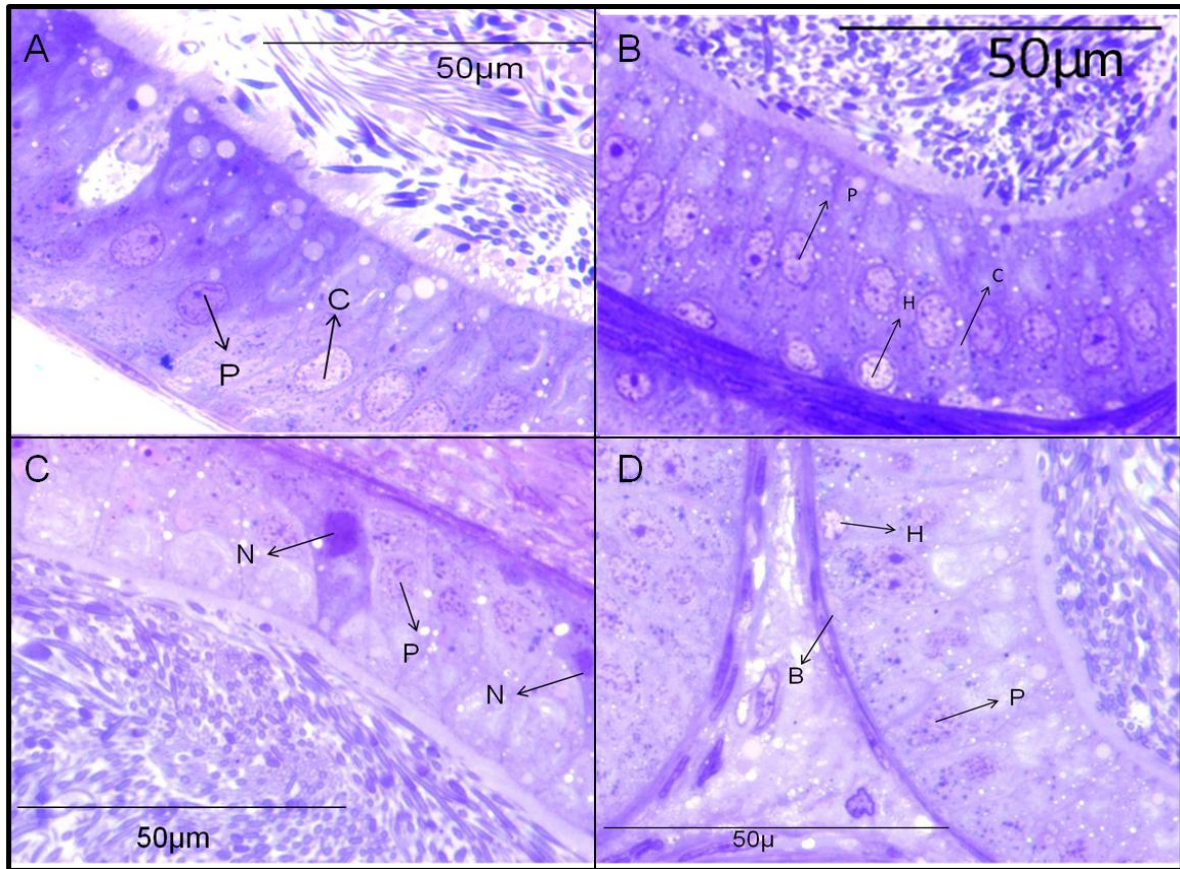


Figura 9. Fotomicrografías de cuatro diferentes túbulos (A-D) de la región cefálica del epidídimo de *C. mexicanus*; septiembre, donde se muestran los diferentes tipos celulares epiteliales. C= células claras; B= células basales; H= célula halo; N= célula estrecha; P= célula principal.

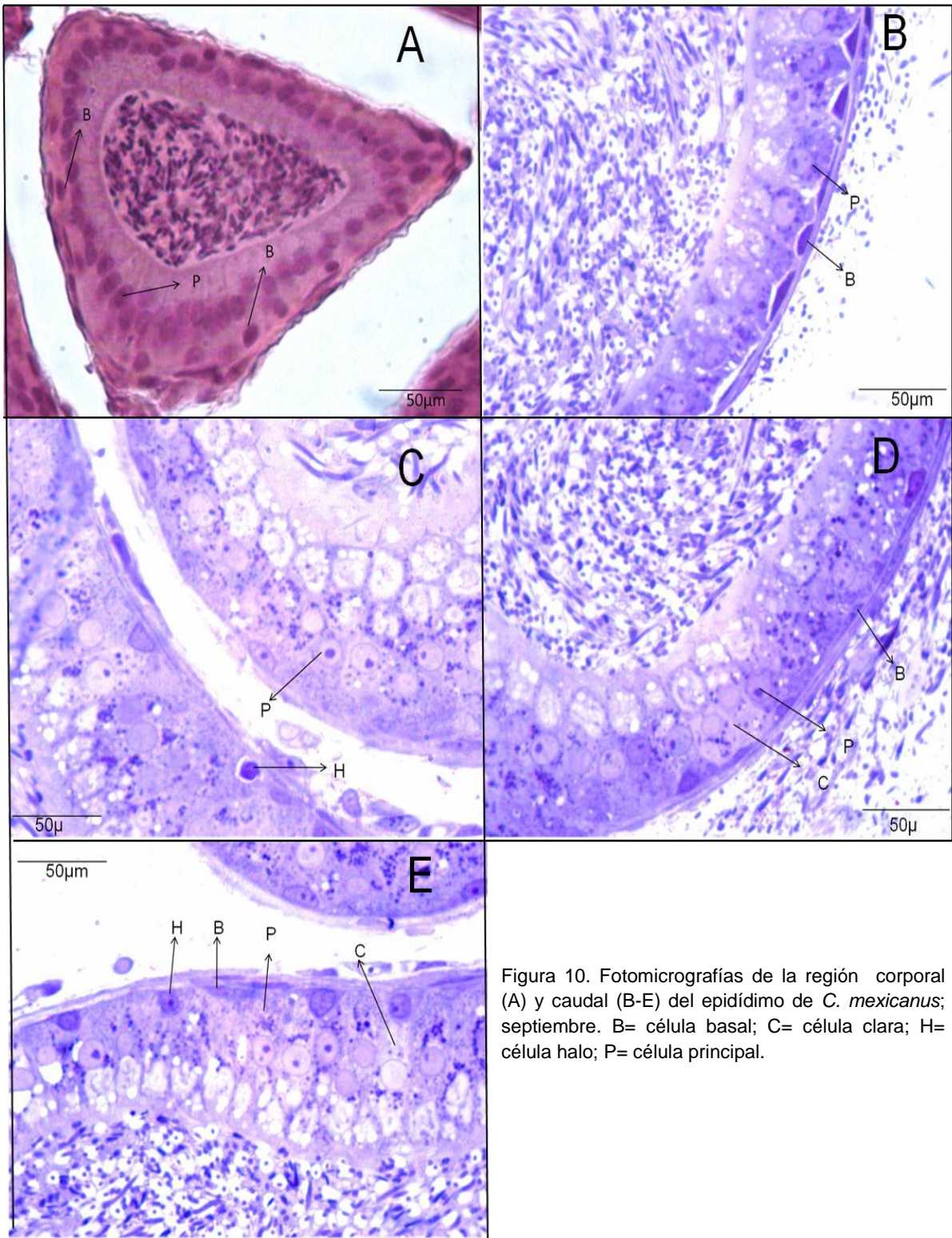


Figura 10. Fotomicrografías de la región corporal (A) y caudal (B-E) del epidídimo de *C. mexicanus*; septiembre. B= célula basal; C= célula clara; H= célula halo; P= célula principal.

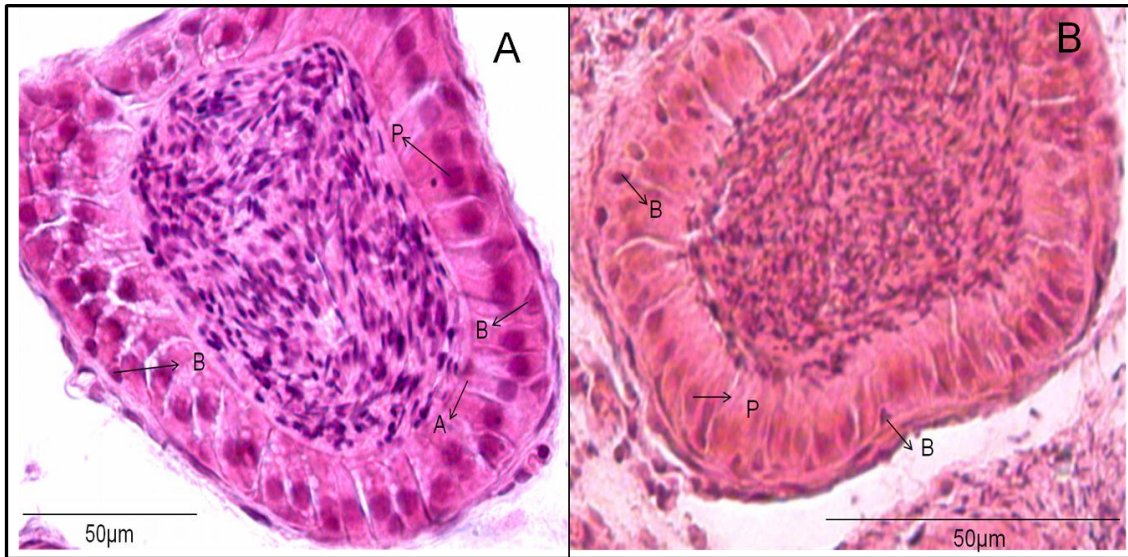


Figura 11. Fotomicrografía de la región corporal (A) y caudal (B) del epidídimo de *C. mexicanus*; octubre. A= célula apical; B= célula basal; P= célula principal.

El largo periodo de almacenamiento de espermatozoides en este quiróptero, como lo reportan Cervantes *et al.* (2008), pudiera ser requerido para que el espermatozoide concluya su total madurez, por lo cual se requiere la participación de diversos tipos celulares que puedan ayudar en el proceso de maduración de los espermatozoides, como es el caso de las células claras, que en estudios realizados en rata, se determinó son capaces de fagocitar la gota citoplasmática que recorre de la pieza media del espermatozoide al annulus, en el corpus y cauda del epidídimo (Hermo *et al.*, 1988), por lo que la presencia de este tipo celular a lo largo del túbulo epididimario, desde el momento en que ingresan los espermatozoides a la región cefálica del túbulo epididimario a finales de agosto (figura 7), hasta el momento en que termina el periodo de almacenamiento en la región caudal, es necesaria para que los espermatozoides completen su maduración.

Lo anterior, es una evidencia de que el proceso de maduración requiere de la participación de tipos celulares que se encuentren involucrados con una función endocítica, como son las células principales y claras, no sólo en la región cefálica y corporal, sino también en la cauda del epidídimo, ya que al ser millones de espermatozoides se necesitan muy buenos mecanismos endocíticos como los presentes en estos tipos celulares, que permitan la formación de vesículas pinocíticas para llevar a cabo la absorción de la gota citoplasmática (Hermo *et al.*, 1988; Oko *et al.*, 1993), durante el tiempo en que son almacenados.

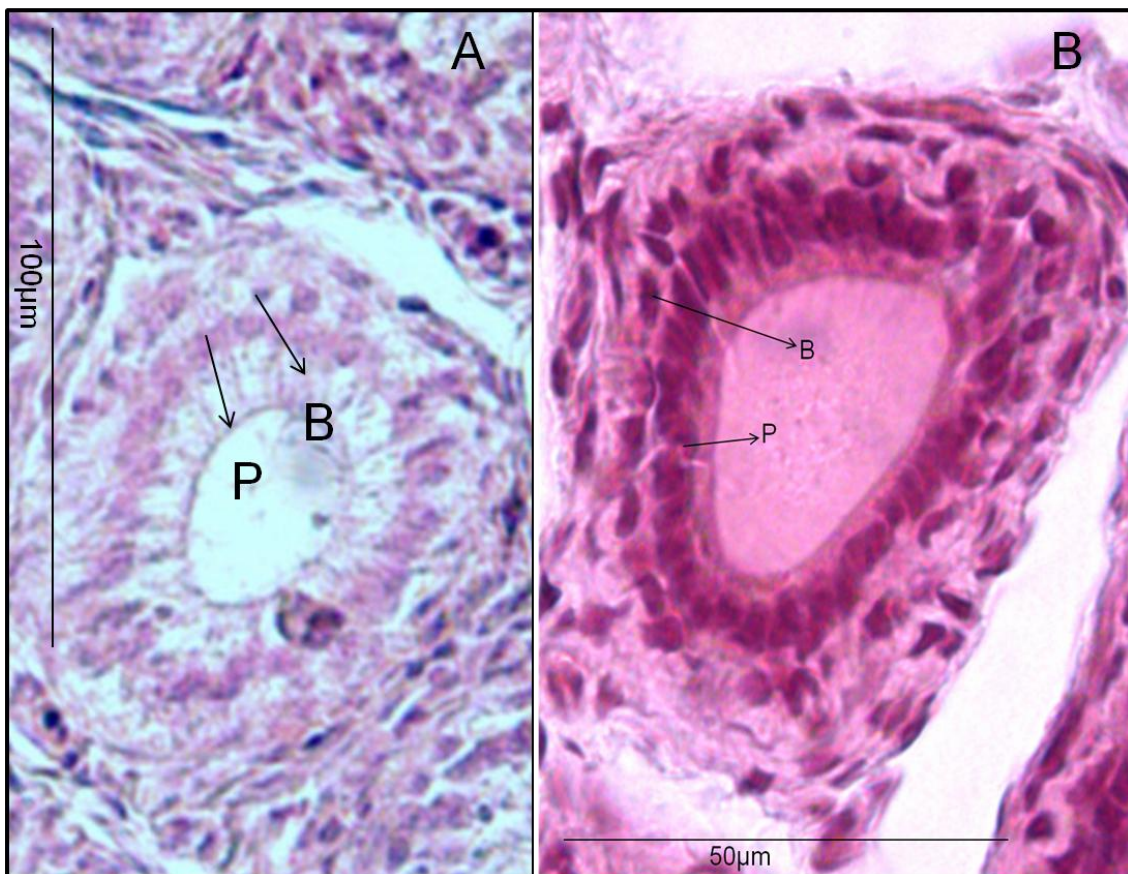


Figura 12. Fotomicrografías de la región cefálica (A) y corporal (B) del epidídimo de *C. mexicanus*; diciembre. B= célula basal; P= célula principal.

VIII.1.2 Morfometría comparativa del túbulo epididimario en las tres principales regiones anatómicas del epidídimo

Las diferentes regiones del epidídimo fueron analizadas para comparar las características del túbulo epididimario, las cuales también fueron comparadas tomando en cuenta cinco fechas representativas del ciclo epididimario (febrero, junio, septiembre, octubre y diciembre) (figura 13). Dentro de la variación morfométrica del túbulo epididimario se observó que existe una clara diferencia en el área total del túbulo epididimario de la región caudal con respecto a las otras dos regiones (figura 13), observándose un incremento del área total del túbulo epididimario desde febrero y hasta el mes de septiembre, manteniendo los valores más altos la región caudal, a partir del mes de septiembre. En la región cefálica sólo dos meses presentan valores significativamente distintos a los meses anteriores, el mes de septiembre presenta una diferencia mayor que en los meses de junio y octubre que presentan valores menores con respecto a septiembre. En la región del cuerpo, junio es sumamente mayor que febrero, septiembre de junio y octubre es menor que septiembre. En la región caudal, la única diferencia significativa se presentó el mes de septiembre.

En el caso del área de la luz del túbulo (figura 14), se mantiene un comportamiento muy similar al observado para el área total del túbulo, los valores que presenta la región caudal a partir del mes de septiembre son significativamente superiores a las otras dos regiones, manteniéndose con valores muy por encima de las otras regiones hasta diciembre. Las diferencias encontradas para la región cefálica entre los diferentes meses representativos del ciclo epididimario muestran que septiembre

presenta diferencias significativas mayores con respecto a octubre. En la región del cuerpo las diferencias observadas fueron en los mismos meses, con un comportamiento similar. En la región caudal, sólo el mes de septiembre muestra diferencias significativas con respecto a junio.

En el tejido de la región caudal del epidídimo (figura 15), se repite lo sucedido con el área tubular total y el área luminal, la región caudal presenta los valores más altos incrementándose a partir de septiembre continuando así hasta diciembre. Las diferencias encontradas entre meses en la región cefálica son que, octubre es significativamente menor que septiembre. En el cuerpo del epidídimo se observa que junio presenta valores mayores que febrero, septiembre es evidentemente mayor que junio y diciembre también muestra valores más altos que octubre. Por último, la región caudal muestra diferencias en los meses de septiembre y octubre, siendo septiembre mayor que junio y octubre menor que septiembre.

Las medidas registradas para el epidídimo de *C. mexicanus* van cambiando conforme avanza el ciclo epididimario. Los datos obtenidos del área, coinciden con los datos reportados del peso epididimario de *C. mexicanus*, por León-Galván *et al.* (2005), donde se muestra una clara diferencia entre la región caudal con respecto a la cabeza y cuerpo, sobre todo en la parte inicial de almacenamiento espermático epididimario (septiembre), esto se relaciona con la presencia de espermatozoides que recorren el túbulo epididimario de región cefálica a caudal, mostrando un evidente tránsito de espermatozoides entre las regiones cefálica y corporal del epidídimo, de un mes aproximadamente, lo que concuerda con lo observado por

Cervantes *et al.* (2008), en donde no se observa presencia de espermatozoides en la región cefálica en el mes de octubre, y manteniéndose almacenados en la región caudal del epidídimo, en el mes de diciembre.

En el momento en que el área total del túbulo epididimario aumenta (figura 13), es evidente la presencia de espermatozoides, lo cual concuerda en el momento en que aumenta el área de la luz del túbulo, ya que conforme ingresan los espermatozoides al epidídimo, se va agrandando y por lo tanto se presenta un aumento en el área en la luz del túbulo, continuando hacia la región corporal, conforme transitan los espermatozoides por el túbulo, y siendo aún mayor en el momento que llegan a la región caudal (figura 14). Conforme se desplazan los espermatozoides a la región caudal va disminuyendo el área en la cabeza, recuperando nuevamente su condición, lo cual indica claramente una diferencia en el área total del epidídimo de un mes entre regiones (figura 13). Es de esperarse que el área del tejido del epitelio epididimario de *C. mexicanus* presente valores menores que el área de la luz del túbulo epididimario, puesto que conforme aumenta el área en la luz del túbulo por la presencia de espermatozoides, se reduce el área en el tejido epitelial, debido tal vez al estiramiento que sufre al aumentar de tamaño el túbulo epididimario. Otra razón pudiera ser, porque mucho del contenido del citoplasma de los diferentes tipos celulares que se encuentran conformando el tejido epitelial, parece vaciarse hacia la luz del túbulo al entrar en contacto con los espermatozoides que ingresan al epidídimo y en el momento que la región del epidídimo va quedando sin espermatozoides, se va restableciendo el tejido epitelial, lo cual es necesario para la

llegada de nuevos espermatozoides que participarán en el próximo ciclo epididimario.

La evidente presencia de espermatozoides que se almacenan en la cauda del epidídimo al llegar el mes de septiembre y conforme transcurren los siguientes meses, permite confirmar el largo periodo de almacenamiento reportado por León-Galván *et al.* (2005); La actividad por parte de los diversos tipos celulares del epitelio es necesaria para el mantenimiento y viabilidad de los espermatozoides, lo que ya se ha reportado para la mayoría de especies de mamíferos, lo que no se ha reportado, es que el tejido del túbulo epididimario parece estar participando en el proceso de maduración de los espermatozoides (Cervantes *et al.*, 2008).

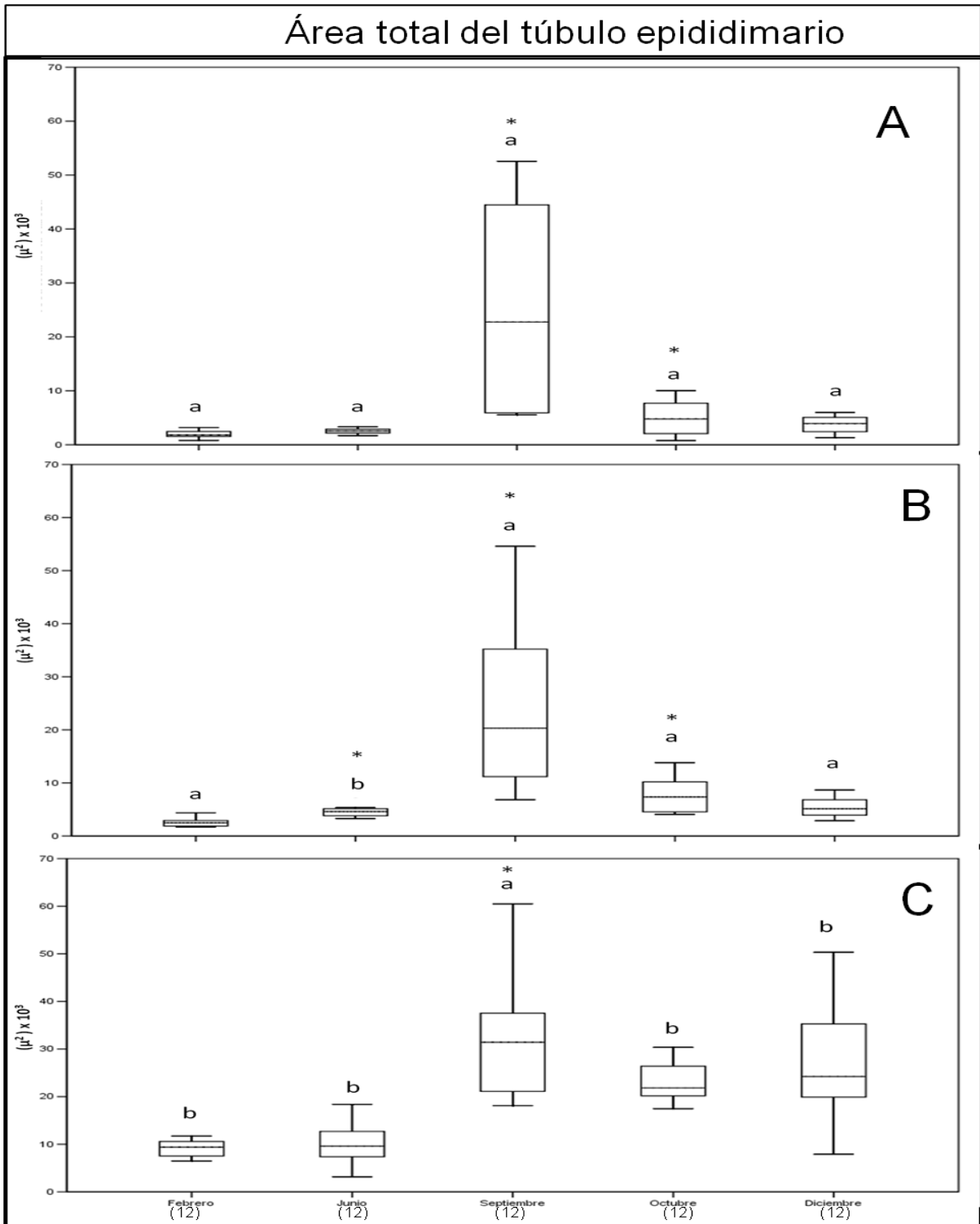


Figura 13. Área total del túbulo. A) cabeza, B) cuerpo, C) cola. Los puntos representan la mediana y cuartiles. Letras indican diferencias significativas cuando se comparan los valores para las tres regiones epididimarias en cada fecha de estudio. El * indica diferencias significativas en el valor de un mes respecto al mes anterior en la comparación para misma región. Para las comparaciones se utilizó Test Z de K-Wallis, $p < 0.05$, para un número (n) de 12 túbulo epididimarios medidos por mes (6 túbulo por epididimo por murciélago).

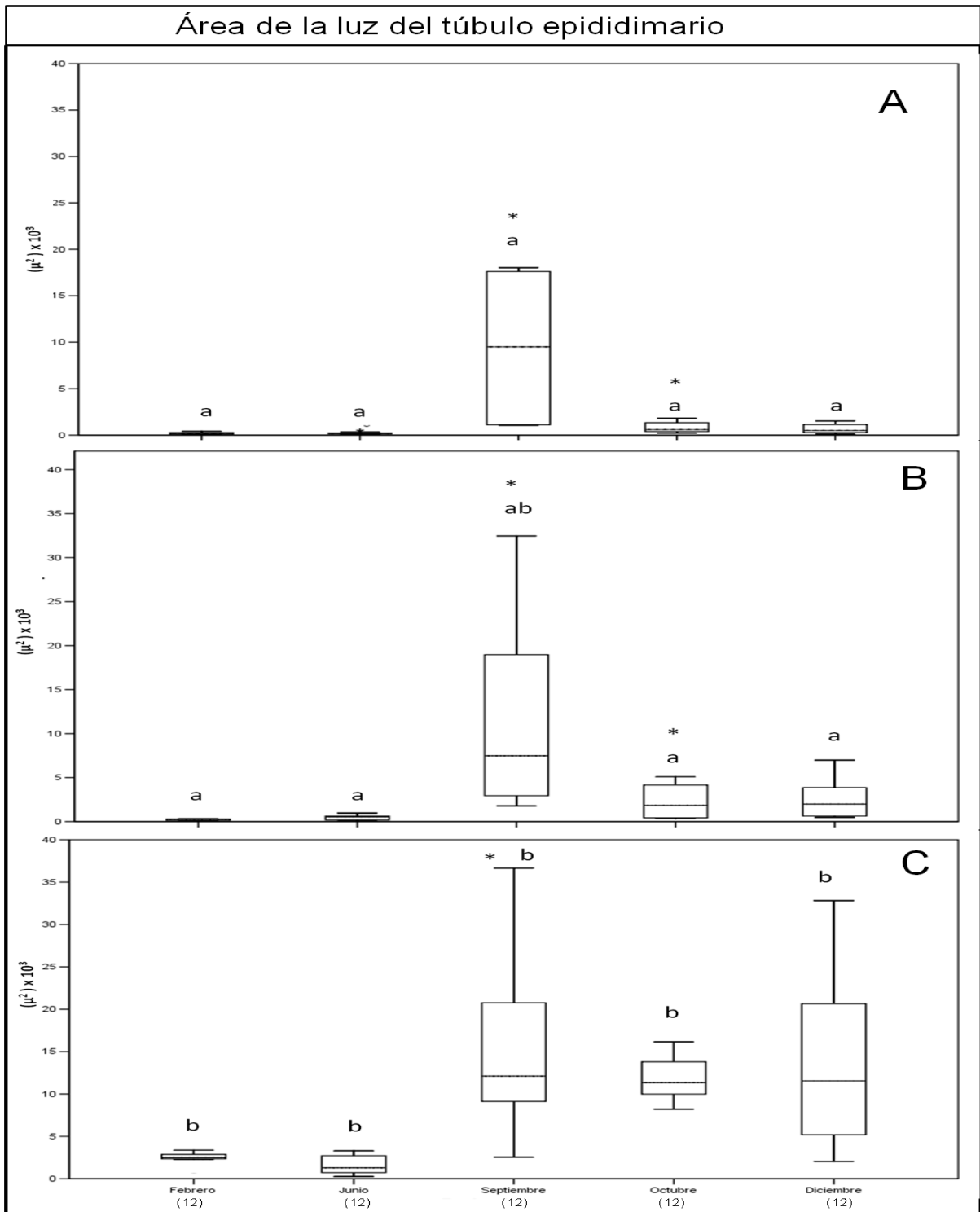


Figura 14. Área de la luz del túbulo. A) cabeza, B) cuerpo, C) cola. Los puntos representan la mediana y cuartiles. Letras indican diferencias significativas cuando se comparan los valores para las tres regiones epididimarias en cada fecha de estudio. El * indica diferencias significativas en el valor de un mes respecto al mes anterior en la comparación para misma región. Para las comparaciones se utilizó Test Z de K-Wallis, $p < 0.05$, para un número (n) de 12 túbulos epididimarios medidos por mes (6 túbulos por epidídimo por murciélago).

Área total del tejido epitelial del túbulo epididimario

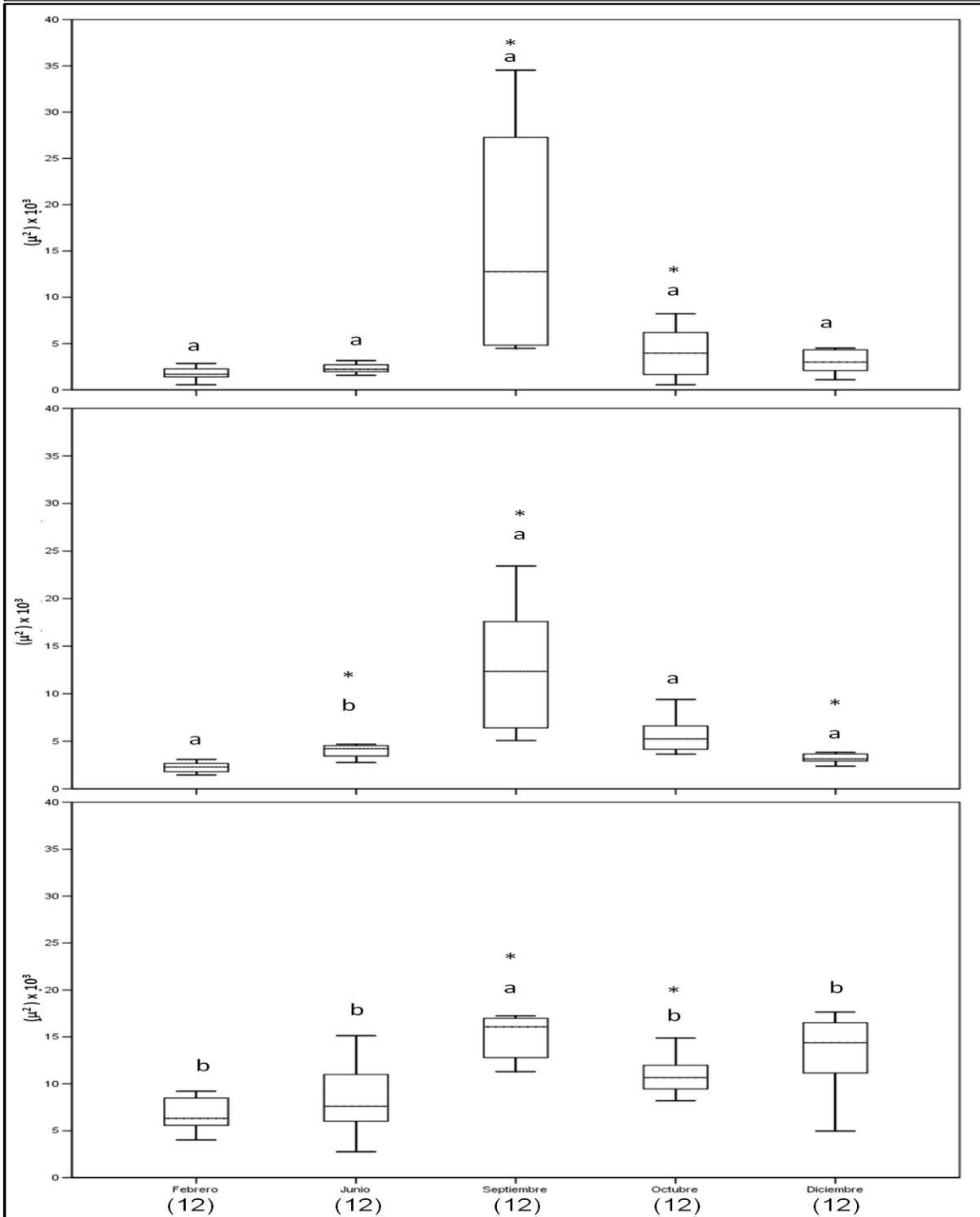


Figura 15. Área del tejido epitelial epididimario. A) cabeza, B) cuerpo, C) cola. Los puntos representan la mediana y cuartiles. Letras indican diferencias significativas cuando se comparan los valores para las tres regiones epididimarias en cada fecha de estudio. El * indica diferencias significativas en el valor de un mes respecto al mes anterior en la comparación para misma región. Para las comparaciones se utilizó Test Z de K-Wallis, $p < 0.05$, para un número (n) de 12 túbulos epididimarios medidos por mes (6 túbulos por epidídimo por murciélago).

VIII.2 Características morfológicas de los espermatozoides epidídimarios en relación con su maduración en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*

VIII.2.1 Morfometría y ultraestructura

Los resultados de morfología muestran que el espermatozoide de *Corynorhinus mexicanus* mide en total 73 μm de largo, desde la parte más apical de la cabeza y hasta la punta de la cola (tabla 1). Externamente se encuentra cubierto por una membrana plasmática, en donde se puede observar con claridad el pequeño espacio que la separa de la membrana acrosomal externa (figura 16 A y 17). En la parte terminal del acrosoma, es evidente el segmento ecuatorial, lo cual concuerda con lo mencionado por Eddy (2006), en donde forma una banda que aproximadamente se superpone a la línea ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (figura 18). Presenta una cabeza en forma de espátula (figura 16), ya que desde la base y hasta la punta de la cabeza se observa muy ancha, alcanzando valores de 2 μm , con un largo de 5.2 μm . El núcleo cubre casi por completo el tamaño de la cabeza que conecta con la membrana acrosomal interna y externa. Además de las membranas plasmática y acrosomal, existe un pequeño espacio entre núcleo y el acrosoma, conocido como espacio subacrosomal, el cual es bastante evidente, y una estructura que sobresale desde el espacio subacrosomal hacia la punta del espermatozoide, llamado perforatorium (figura 17).

Tabla 1. Principales medidas del espermatozoide de *Corymorhinus mexicanus*. Longitud total del espermatozoide, longitud de la cabeza, ancho de la cabeza y longitud del flagelo (μm). $n=700$ espermatozoides.

	LONGITUD DEL ESPERMATOZOIDE (μm)	LONGITUD DE LA CABEZA (μm)	ANCHO DE LA CABEZA (μm)	LONGITUD DEL FLAGELO (μm)
Promedio \pm DE	73.0 ± 6.4	5.2 ± 0.5	2.0 ± 0.1	67.7 ± 6.4

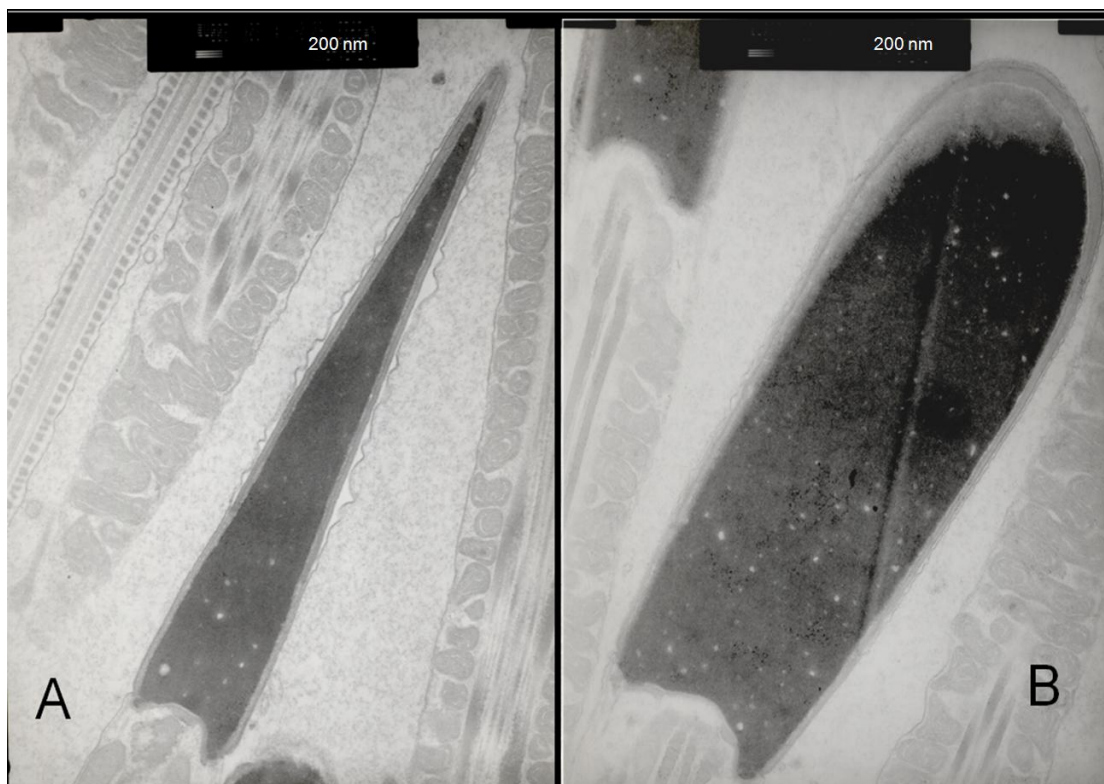


Figura16. Electromicrografías de la cabeza del espermatozoide de *Corymorhinus mexicanus*. Presenta una cabeza en forma de espátula, externamente se encuentra cubierto por una membrana plasmática. A) Sección sagital; B) sección frontal.

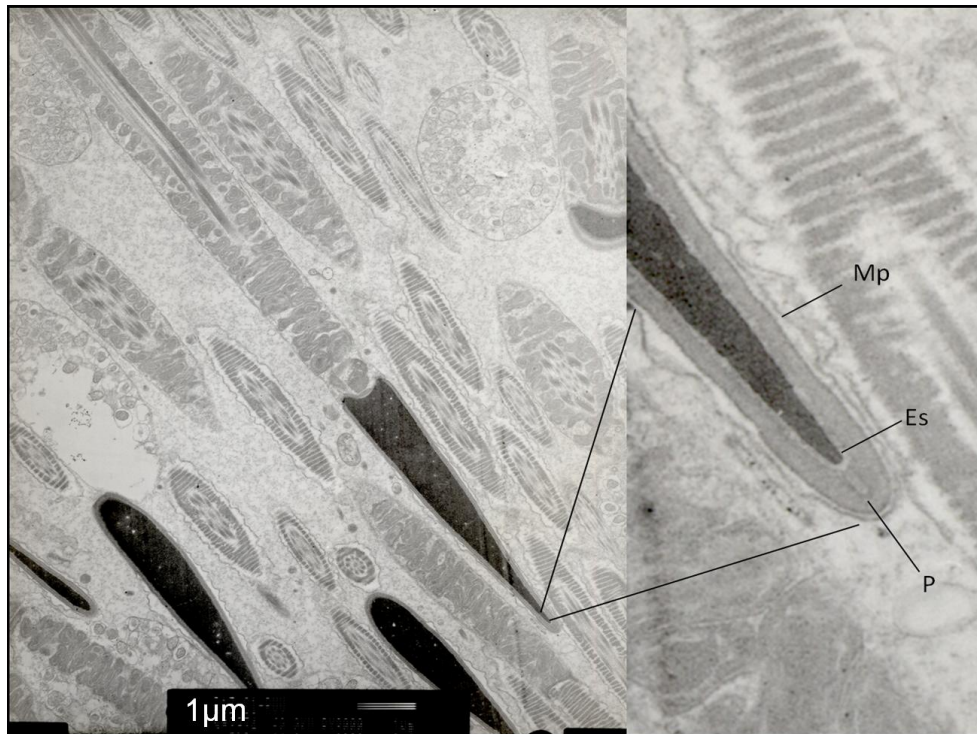


Figura 17. Electromicrografías donde se muestra un aumento en la parte apical de la cabeza del espermatozoide de *C. mexicanus*. Es= espacio subacrosomal; Mp= membrana plasmática; N= núcleo; P= perforatorium.

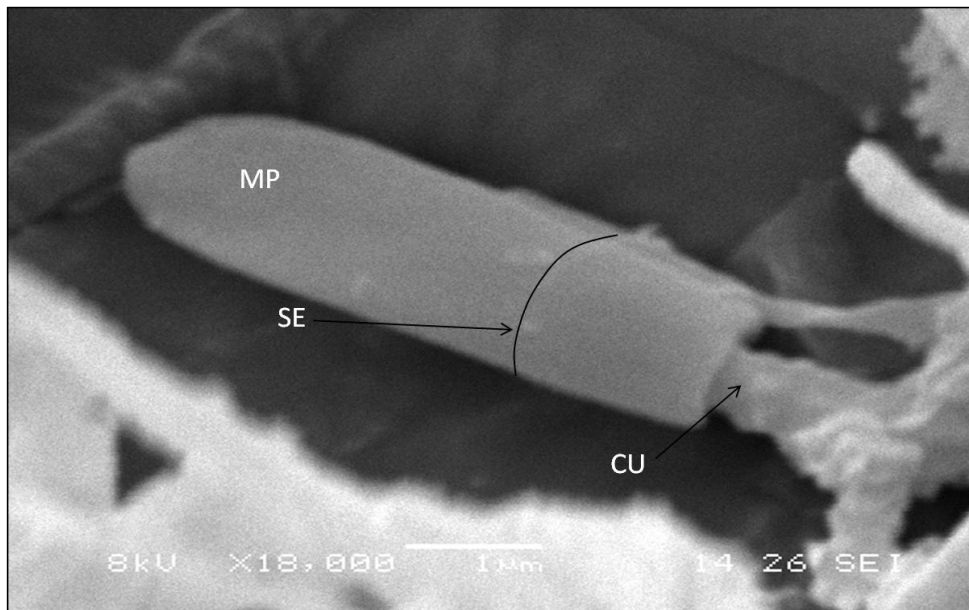


Figura 18. Electromicrografía del espermatozoide de *C. mexicanus*. SE= Segmento ecuatorial; MP= membrana plasmática; CU= cuello del epermatozoide.

El espacio subacrosomal en *C. mexicanus* no concuerda con lo reportado por Fawcett (1970), quien menciona que el espacio subacrosomal es muy prominente en la cabeza de espermatozoides con forma falciforme como la de roedores, puesto que como se observa en las figuras 16 A y 17, esta estructura recorre gran parte de la cabeza del espermatozoide, hasta tocar con el segmento ecuatorial. Oko y Clermont (1988), mencionan que el perforatorium en especies en donde la cabeza del espermatozoide tiene forma de espátula, esta estructura se encuentra en menor proporción. En las figuras 16 A y 17 se observa que en este murciélago el perforatorium no es tan reducido como se menciona para otros mamíferos no quirópteros.

En la pieza de unión se pudo determinar la presencia del centriolo proximal y el plato basal (figura 19), en donde a su vez se observa que el cuello es muy estrecho y se encuentra inmerso en una fosa de implantación al contacto con la cabeza. El flagelo mide 67.7 μm y muestra sus cuatro regiones características (Millete, 1999; Eddy, 2006), cuello, pieza media, pieza principal y terminal. Además de la típica estructura del axonema compuesto de un complejo de "9 + 2" microtúbulos que se extienden por todo lo largo del flagelo (figura 19). También se observó la vaina mitocondrial, con una agrupación de mitocondrias en forma de hélice, el filamento axial, así como otras fibras densas, y como evidencia de inmadurez, la gota citoplasmática. Por último el annulus, como una estructura particular que une la pieza media con la pieza principal.

De acuerdo a lo reportado por Millete (1999) y Eddy (2006), en donde se aprecia como una referencia de la longitud total del espermatozoide, que en humano alcanza una longitud de 55 μm y el de hámster chino 250 μm . Comparado con otros quirópteros, la longitud total del espermatozoide de *C. mexicanus* se encuentra dentro de los más largos, siendo sólo algunos los que lo superan en tamaño, de acuerdo con los datos de Cummins y Woodall (1985), quienes mencionan el caso de *Miniopterus schreibersii*, el cual alcanza una longitud total de 108.9 μm .

La longitud de la cabeza del espermatozoide de *C. mexicanus* es mayor a la de muchas especies de diversas familias de quirópteros, incluso de los espermatozoide de su misma familia, pero no así el ancho de su cabeza ya que de acuerdo a Cummins y Woodall (1985), el ancho de la cabeza de muchos otros murciélagos se encuentra en un rango de 1.8 μm a 5.06 μm , lo cual colocaría a la cabeza del espermatozoide de esta especie como delgada dentro de su grupo. La base del núcleo del espermatozoide tiene una evidente forma de herradura, el centriolo proximal se conecta directamente a la placa basal, lo que forma una fosa, la placa basal se une al núcleo y llena la fosa de implantación. De esta forma, es que se une el núcleo del espermatozoide del murciélago *Platyrrhinus lineatus*, (Beguelini *et al.*, 2011).

Comparando las mitocondrias de la vaina mitocondrial de este último murciélago con la de *C. mexicanus*, se observa que las mitocondrias de *P. lineatus* se encuentran alineadas directamente con el eje axial, al parecer con la misma proporción en tamaño. En *C. mexicanus* se observa que las mitocondrias no se encuentran

alineadas al eje axial, sobrepuestas unas con otras (figura 19), lo cual genera una evidente diferencia entre las estructuras de estos dos murciélagos. Estas particularidades son como lo mencionan Roy *et al.* (2004), que la forma de hélice que presentan las mitocondrias se realiza en pares, y que el número de giros y la longitud de las mitocondrias varían entre especies. En el ratón por ejemplo, están dispuestas en dos hélices paralelas, con un promedio de 87 vueltas. Como se observa en los cortes transversales de la figura 19, las otras fibras densas en la pieza media varían, en forma y tamaño, a lo largo del espermatozoide hasta la parte distal de la cola. Se ha descrito (Fawcett, 1975, citado en Eddy, 2006) que no terminan en la parte proximal de la pieza media en el espermatozoide de humanos, macaca y murciélagos, sino que se extienden hasta cerca de la parte final de la pieza principal, en la rata, hámster, conejillo de indias y ardilla.

Una estructura que ha sido estudiada para la mayoría de espermatozoides de mamíferos es el acrosoma (figura 17), ya que se ha propuesto por parte de diversos autores como Bedford (1963) y Bedford y Nicander (1971), que existe remodelación de esta estructura conforme los espermatozoides recorren el túbulo epididimario, proponiendo que se ve reducido al llegar a la región caudal del mismo. El acrosoma del espermatozoide de *C. mexicanus* tomado de la región caudal del epidídimo, durante la fecha en que apenas ingresan los espermatozoides a esta región, en la cual se considera se lleva a cabo el proceso de maduración e inicio del periodo de almacenamiento, se observa todavía grueso y hacia la punta de la cabeza, lo cual pudiera ser una evidencia de que el espermatozoide de esta especie no ha

concluido su maduración. El perforatorium, es una estructura que ha generado discusión en cuanto a su localización, formación y función. Lalli y Clermont (1981), han definido esta estructura como parte de una cápsula rígida, denominada como teca perinuclear, la cual envuelve a todo el núcleo, al parecer empieza al final del acrosoma y comprende el resto de la teca perinuclear. Sin embargo, la estructura que brinda una evidencia de la maduración del espermatozoide es la gota citoplasmática, la cual se presenta en el espermatozoide de *C. mexicanus* con una alta frecuencia (figura 20), particularmente en la pieza media, lo que para la mayoría de mamíferos no corresponde, ya que diversos autores mencionan que la maduración del espermatozoide termina en la parte distal del cuerpo del epidídimo, y si existiera presencia aún de gota citoplasmática, esta debería encontrarse ya en la pieza principal o terminal (Bedford, 1963; Bedford y Nicander, 1971; Temple-Smith, 1984; Cooper, 1999; Robaire *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2007).

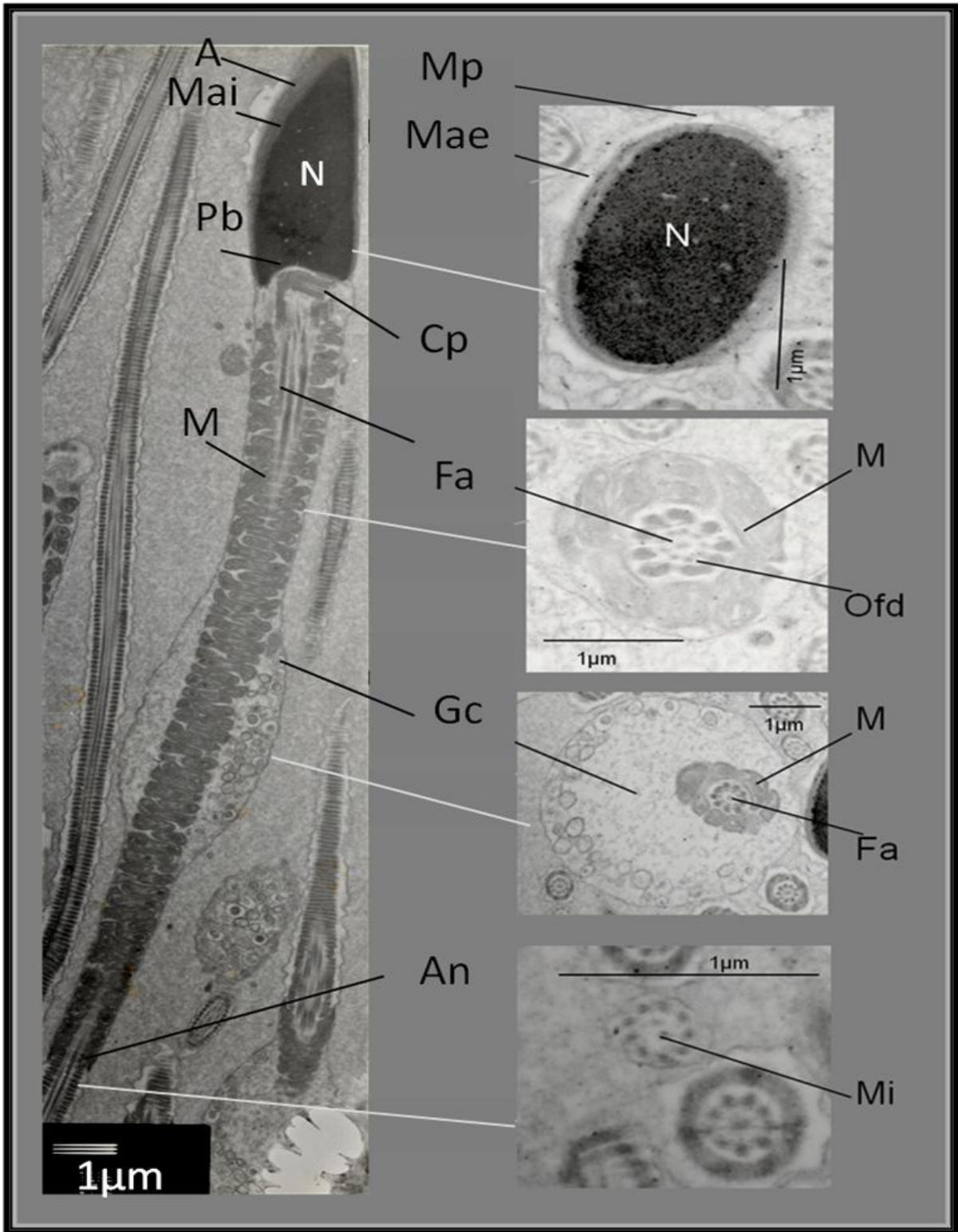


Figura 19. Composición de electromicrografías en donde se muestra la ultraestructura del espermatozoides de *C. mexicanus* en corte longitudinal y cortes transversales. A= acrosoma; An= annulus; Cp= centriolo proximal; Fa= Filamento axial; Gc= Gota citoplasmática; M= mitocondrias; Mae= membrana acrosomal externa; Mai= membrana acrosomal interna; Mi= microtúbulos; Mp= membrana plasmática; N= núcleo; Ofd= otro fibras densas; Pb= plato basal

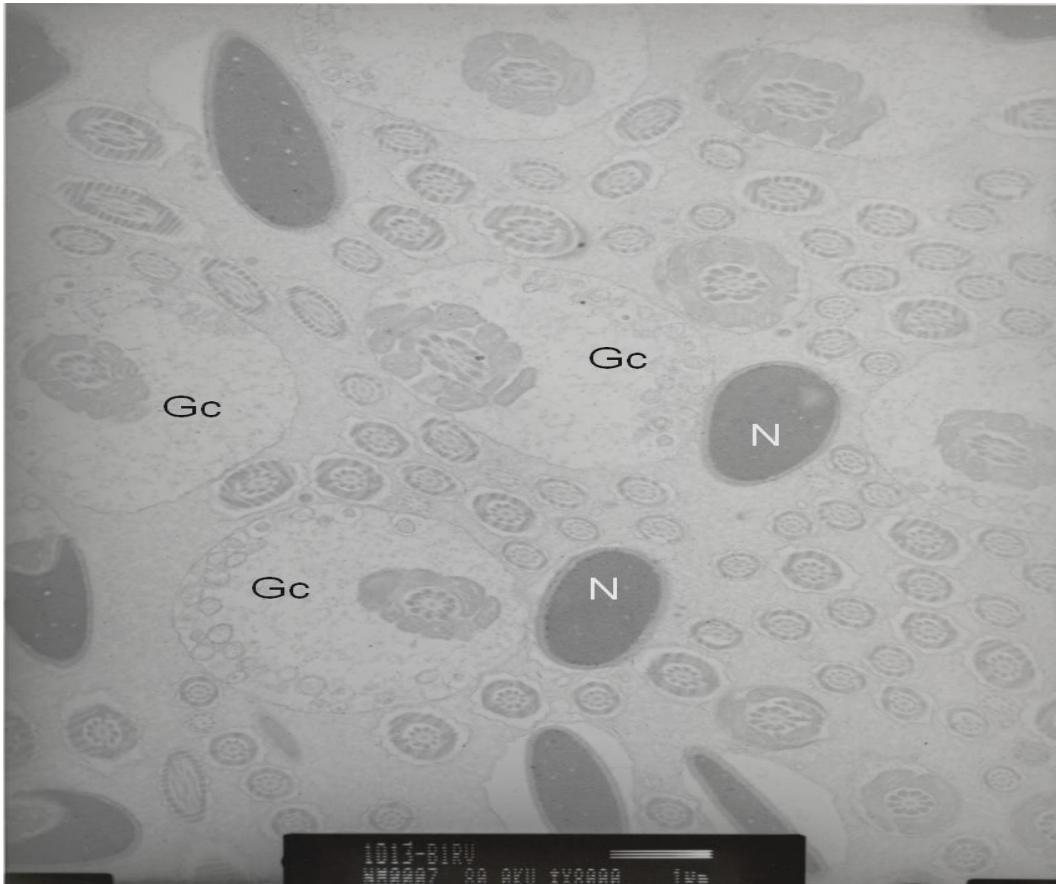


Figura 20. Electrotopografía de los espermatozoides de *C. mexicanus*, tomados de la región caudal del epidídimo. Gc= gota citoplasmática; N= núcleo.

IX. CONCLUSIONES

El epitelio del epidídimo de *Corynorhinus mexicanus* muestra variaciones en las diferentes áreas analizadas (total, luz y epitelial) a lo largo del ciclo epididimario y entre las diferentes regiones, siendo así que la región caudal presenta los valores más altos en cuanto a su área, a diferencia de la región cefálica y corporal, esto es evidencia de una maduración morfológica. La presencia de epididimosomas en la región caudal, es evidencia de actividad por parte de los tipos celulares, relacionada con la maduración. La ultraestructura del espermatozoide de *C. mexicanus* muestra

la presencia de gota citoplasmática en la pieza media del flagelo de un gran número de espermatozoides, además de que se encontró que el acrosoma es más grueso y localizado hacia la punta del espermatozoide, lo cual es indicativo de espermatozoides inmaduros en la región caudal. Estas evidencias histológicas y morfológicas en el epidídimo y espermatozoides de *C. mexicanus* apoyan la idea de que en este mamífero la maduración termina en la región caudal, y es un proceso lento que parece estar relacionado con el largo periodo de almacenamiento.

X. ANEXO I

Medios

Medio para la obtención de espermatozoides: Ringer (NaCl 95 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 1.7 mM; KH₂PO₄ 1.1 mM).

Reactivos y Soluciones

Polilisina (0.1%), Eosina-Nigrosina (Eosina 1%; Nigrosina 10%) Hematoxilina de Harris, Eosina.

Tinción de Eosina-Nigrosina

Colorante específico para morfología y viabilidad: Se colocaron 10 µl de espermatozoides-eosina/nigrosina en un portaobjetos, se dejaron secar al aire para un posterior conteo.

Tinción de Hematoxilina-Eosina

Colorante específico para tejidos animales

- 1) Desparafinar (Xilol 3 min)
- 2) Hidratar los cortes (baños de alcohol decreciente)
- 3) Coloración o Tinción (Hematoxilina 3-5 min)
- 4) Lavado (2 baños de 1 min)
- 5) Diferenciar (alcohol ácido)
- 6) Virar
- 7) Coloración o Tinción (Eosina 3-5 min)
- 8) Deshidratación (baños crecientes de alcohol hasta llegar a 100%)
- 9) Aclarar (Xilol 1 min)

XI. BIBLIOGRAFÍA

Aitken RJ, Gordon E, Haréis D, Twigg J, Milne P, Jennings Z e Irvine S. 1998. Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59: 1037-1046.

Adamali HI y Hermo L. 1996. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *Journal of Andrology* 17: 208–222.

Amman RP y Schambacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science* 57: 380-403.

Andodian S y Hermo L. 1999. Cell and region specific localization of lysosomal and secretory proteins and endocytic receptors in epithelial cell of the cauda the epididymidis and vas deferens of the adult rat. *Journal of Andrology* 20: 415-429.

Arenas-Ríos E, León MA, Mercado E y Rosado A. 2005. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase during epididymal maturation and prolonged storage of spermatozoa in the mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Canadian Journal of Zoology* 83: 1556-1565.

Arenas-Ríos E. 2009. Enzimas anti-especies reactivas de oxígeno, como reguladores en los procesos de espermatogénesis maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.

Awano M, Kawaguchi A y Mohri H. 1993. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 99: 375-383.

Bedford JM. 1963. Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. *Journal of Reproduction Fertile* 5: 169-177.

Bedford JM y Nicander L. 1971. Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey. *Journal of Anatomy* 108: 527-543.

Beguelinia MR, Pugab CI, Tabogaa SR y Morielle-Versuteb E. 2011. Ultrastructure of spermatogenesis in the white-lined broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Micron* 42: 586-599.

Bellvé AR, Chandrika R, Martinova YS y Barth AH. 1992. The perinuclear natrix as a structural element of the mouse sperm nucleus. *Biology of Reproduction* 47: 451–465.

Bozzola JJ y Russell LD. 1992. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones and Bartlett Publisher Canada, Canada, Pp 48-71.

Brown D y Montesano R. 1980. Membrane specialization in the rat epididymis. I. Rod-shaped Intermembrane particle in the apical (mitochondrial-rich) cell. *Journal Cell Science* 45: 187-198.

Cervantes LI, Arenas E, León MA, López R, Ambríz GD y Rosado A. 2008. Spermatozoa epididymal maturation in the mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine* 54: 196-204.

Christine A. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89: 65-75.

Cooper T. 1999. Epididymis. En: E Knobil y DJ Neill, ed. *Encyclopedia of reproduction*, volumen 2. Academic Press, San Diego, California, EUA, Pp 1-17.

Crabo B. 1965. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. *Acta Veterinaria. Scandinavica* 5: 1-94.

Crichton EG, Suzuki F, Krutzsch PH y Hammerstedt RH. 1993. Unique features of the cauda epididimal epithelium of hibernating bats may promote sperm longevity. *The Anatomical Record* 237: 475-481.

Crichton EG, Hinton BT, Pallone TL y Hammerstedt R. 1994. Hypersmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *American Physiological Society* 267: R1363-R1370.

Crichton EG. 2000. Sperm storage and fertilization. In: Reproductive biology of bats (EG. Crichton, ed.). Academic Press, London. Pp. 295–320.

Cummins JM y Woodall PF. 1985. On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility* 75: 153-175.

Danzo B, Pavlou S, Anthony H. 1990. Hormonal regulation of androgen-binding protein in the rat. *Endocrinology* 127: 2829-2838.

D'Addario D, Turner T, y Howards S. 1980. Effect of vasectomy on the osmolarity of hamster testicular and epididymal intraluminal fluid. *Journal of Andrology* 1: 167-170.

Delongias J, Gelly J, Leheup B y Grignon G. 1987. Influence of testicular secretions on differentiation of the rat epididymis: ultrastructural studies after castration, efferent duct ligation and cryptorchidism. *Experimental Cell Biology* 55: 74–82.

Eddy E, Vermon R, Muller C, Hahnel A y Fenderson B. 1985. Immunodissection of sperm surface modification during epididymal maturation. *American Journal of Anatomy* 174: 225-237.

Eddy EM. 2006. The spermatozoon. En: E Knobil y DJ Neill, ed. *Physiology of reproduction*, tercera edición. Academic Press is an imprint to Elsevier. EUA, Pp 3-54.

Friend DS. 1982. Plasma-membrane Diversity in a Highly Polarized Cell. *The Journal of Cell Biology* 93: 243-249.

Fawcett DW e IT0 S. 1965. The Fine Structure of Bat Spermatozoa. *American Journal of Anatomy* 116: 567-610.

Fawcett DW. 1970. A Comparative View of Sperm Ultrastructure. *Biology of Reproduction* 2: 90-1 27.

Fournier-Delpech S, Colas G, Courot M, Ortavant R y Brice G. 1979. Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 19: 597–605.

Gage MJG. 1998. Mammalian sperm morphometry. The Royal Society. Proc. R. Soc. Lond. B 265: 97-103.

Girouard J, Frenette G y Sullivan R. 2009. Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 80: 965–972.

Gustafson AW. 1979. Male reproductive patterns in hibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility* 56: 317-331.

Hayat MA. 1993. Stains and cytochemical methods. Plenum Press, New York. Pp. 57-58.

Hermo L, Dworkin J y Oko R. 1988. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *American Journal of Anatomy* 183: 107-124.

Hermo L. 1995. Structural features and functions of principal cells of the intermediate zone of the epididymis of adult rats. *The Anatomical Record* 242: 515–530.

Hermo L, Barin K y Robaire B. 1992. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. *The Anatomical Record* 233: 205–228.

Hermo L y Robaire B. 2002. Epididymis cell types and their function. In *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice* (B. Robaire and B. T. Hinton, Eds.). Kluwer Academic/Plenum. New York, Pp 81–102.

Hinrichsen MJ y Blaquier JA. 1980. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility* 60: 291-294.

Hoffer AP, Shalev M y Frisch DH. 1981. Ultrastructure and Maturational Changes in Spermatozoa in the Epididymis of the Pigtailed Monkey, *Macaca nemestrina*. *Andrology* 3: 140-146.

Hamilton D y Gould R. 1980. Galactosyltransferasa activity associated with rat epididymis. *The Anatomical Record* 196:71

Holland MK, Vreeburg JT y Orgebin-Crist MC. 1992. Testicular regulation of epididymal protein secretion. *Journal of Andrology* 13: 1405-1411.

Hopwoud D y Milhe G. 1991. Fixation. In *Electrón microscopy in biology. A practical approach*. Harris R. Editor. Oxford University Press, New York. Pp 1-15.

Huang Y, Chung Y y Wong YD. 1999, Potassium channel activity recorder from the apical membrane of freshly isolated epithelial cells in rat caudal epididymis. *Biology of Reproduction* 60: 1509-1514.

Jeyendran RS, Van der Ven H. H, Perez-Pelaez M, Crabo BG y Janeveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 219-228.

Johnson AL y Howards SS. 1975. Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. *American Journal of Physiology* 228: 556–564.

Johnson L y Varner DD. 1988. Effect of daily sperm production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biology of Reproduction* 39: 812-817.

Jolly SE y Blackshaw AW. 1987. Prolonged epididymal sperm storage, and the temporal dissociation of testicular and accessory gland activity in the common sheath-tail bat, *Taphozous georgianus*, of tropical Australia. *Journal of Reproduction and Fertility* 81: 205-211.

Krutzsch PH. 1979. Male reproductive patterns in non-hibernating bats. *Journal of Reproduction Fertile* 56: 333-344.

Krutzsch PH, Crichton GE y Nagle BR. 1982. Studies on prolonged spermatozoa survival in chiroptera: a morphological examination of storage and clearance of intrauterine and cauda epididymal spermatozoa in the bats *Myotis Lucifugus* and *Myotis velifer*. *American Journal of Anatomy* 165: 421-434.

Krutzsch PH. 2009. The reproductive biology of the cave myotis (*Myotis velifer*). *Acta Chiropterologica* 11: 89-104.

Legare C, Thabet M, Picard S y Sullivan R. 2001. Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct: a reflection on the function of the human epididymis. *Biology of Reproduction* 64: 720-727.

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

León-Galván MA, López R, Hernández P, Arenas E y Rosado A. 2005. Male reproductive cycle of mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *The southwestern naturalist* 50: 453-460.

León-Galván MA. 2008. Participación de la muerte celular por apoptosis durante la espermatogénesis en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.

Lewis B y Aitken J. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biology of Reproduction* 64:1545-1556.

Lorenzana MG, López-wilchis R, Gómez CS y Aranzabal MCU. 2006. A Light and Scanning Electron Microscopic Study of the Epididymis Active State of the Endemic Mexican Rodent *Peromyscus winkelmanni* (Carleton) (Rodentia: Muridae). *Anatomia Histologia Embryologia* 36: 230–240.

Millete C. 1999. Spermatozoa. En: E Knobil y DJ Neill, ed. *Encyclopedia of reproduction*, volumen 2. Academic Press, San Diego, California, EUA, Pp 587-596.

Mori T y Uchida TA. 1981. Ultrastructural observations of fertilization in the japanese long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii fuliginosus*. *Journal of Reproduction and Fertility* 63: 231-235.

Moore HDM y Bedford JM. 1979. Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *The Anatomical Record* 193: 293–311.

Moore HDM y Bedford JM. 1979. The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. *The Anatomical Record* 193: 313–328.

Netzel-Arnett S, Bugge TH, Hess RA, Carnes K, Stringer BW, Scarman AL, Hooper JD, Tonks ID, Kay GF y Antalis TM. 2009. The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Serine Protease PRSS21 (Testisin) Imparts Murine Epididymal Sperm Cell Maturation and Fertilizing Ability. *Biology of Reproduction* 81: 921-932.

Olson ML, Zhou X y Schreiber JR. 1995. Cell-specific localization of apolipoprotein E messenger ribonucleic acid in the testis and epididymis of the rat. *Biology of Reproduction* 52: 1003-1011.

Okamura N. 1998. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation. En: The 6th MAFF International Workshop on Genetic Resources. Tsukuba Ibaraki, Japón, Pp 123-134.

Oko R y Clermont Y. 1988. Isolation, structure and protein composition of the perforatorium of rat spermatozoa. *Biology of Reproduction* 39: 673-687.

Oko R, Hermo L, Chan PTK, Fazel A y Bergeron JJM. 1993. The Cytoplasmic Droplet of Rat Epididymal Spermatozoa Contains Saccular Elements with Golgi Characteristics. *The Journal of Cell Biology* 4: 809-821.

Overstreet JW y Bedford JM. 1974. Importance of sperm capacitation for gamete contact in the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility* 39: 393-398.

Pagenstecher HA. 1859. Über Die Begattung Von Vespetugo pipisfmllus. *Verh. Naturh. Med. Ver. Heideb* 1: 194-195.

Parks JE y Hammerstedt. 1985. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biology of Reproduction* 32:653-668.

Racey PA. 1972. Viability of bat spermatozoa after prolonged storage in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility* 28: 309-311.

Racey PA. 1979. The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *Journal Reproduction and Fertility* 56: 391-402.

Raymond A, Ensslin MA y Shur BD. 2009. SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. *Journal of Cell Biochemistry* 106: 957–966.

Regalado FI. 1992. Proteínas de secreción del epidídimo de conejo: caracterización y regulación por andrógenos y temperatura. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.

Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Jean-Marie F, Vericel E, Grizard G, Vernet P y Drevet JIR. 2006. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biology of Reproduction* 74: 1104-1113.

Reynolds AJ. 1999. Histomorphometry. In Light microscopy in biology. A practical approach. A. J. Lacey (editor). 2nd edition. Oxford University Press, Oxford, New York. Pp. 313-315.

Robaire B y Viger, RS. 1995. Regulation of epididymal epithelial functions. *Biology of Reproduction* 52: 226–236.

Robaire B, Hinton BT, y Orgebin-Crist MC. 2006. The Epididymis. En: E Knobil y DJ Neill, ed. *Physiology of reproduction*, tercera edición. Academic Press is an imprint to Elsevier. EUA, Pp 1071-1148.

Roy A, Yan W, Burns KH y Matzuk MM. 2004. Tektin3 encodes an evolutionarily conserved putative testicular microtubules-related protein expressed preferentially in male germ cells. *Molecular Reproduction and Development* 67: 295–302.

Rowley MJ, Teshima F y Heller CG. 1970. Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertility and Sterility* 21:390-396.

Saez F, Frenette G y Sullivan R. 2003. Epididymosomes and Prostatosomes: Their Roles in Posttesticular Maturation of the Sperm Cells. *Journal of Andrology* 24:149-154.

Setchell BP y Breed WG. 2006. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. En: E Knobil y DJ Neill, ed. *Encyclopedia of reproduction*, volúmen 2. Academic Press, San Diego, California, EUA, Pp 587-596.

Serre V y Robaire B. 1998. Segment specific morphological changes in the aging brown Norway rat epididymis. *Biology of Reproduction* 58: 497–513.

Smith M y Croft S. 1991. Embedding and thin section preparations. In *Electrón microscopy in biology. A practical approach*. Harris R. Editor. Oxford University Press, New York, EUA, Pp. 17-37.

Sokal R y Rohlf J. 1995. *Biometry*. WH Freeman y Co, New York, EUA, Pp 887.

Sullivan R, Frenette G y Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* 9: 483–491.

Tekpetey FR, Veeramachaneni DN y Amann RP. 1989. Localization of androgen receptors in ram epididymal principal cells. *Journal Reproduction and Fertility* 87: 311–319.

Temple-Smith PD. 1984. Phagocytosis of Sperm Cytoplasmic Droplets by a Specialized Region in the Epididymis of the Brushtailed Possum, *Trichosurus vulpecula*. *Biology of Reproduction* 30: 707-720.

Toney TW y Danzo BJ. 1988. Developmental changes in and hormonal Regulation of estrogen and androgen receptors present in the rabbit epididymis. *Biology of Reproduction* 39: 818-828.

Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP y Nguyen QAT. 2003. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125: 871-878

Uchida TA y Mori T. 1972. Electron Microscope Studies on the Fine Structure of Germ Cells in Chiroptera I. Spermiogenesis in Some Bats and Notes on its Phylogenetic Significance. *Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu University* 26: 399-418.

Vernet P, Fulton N, Wallace C y Aitken J. 2001. Analysis of Reactive Oxygen Species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 65: 1102-1113.

Wang Z, Qi-Xian S, Yi-Nan W,, Yan-Ling W y Shu-Yi Z. 2008. Epididymal sperm storage in Rickett's big-footed bat (*Myotis ricketti*). *Acta Chiropterologica* 10: 161-167.

Wimsatt WA. 1960. Some problems of reproduction in relation to hibernation in bats. Bulletin of the Museum of Comparative Zoology Harvard 124: 249-267.

Wimsatt WA, Krutzsch PH y Napolitano I. 1966. Studies on sperm survival mechanisms in the female reproductive tract of hibernating bats. I. Cytology and ultra-structure of intra-uterine spermatozoa in *Myotis lucifugus*. *American Journal of Anatomy* 119: 25-60.

Yanagimachi R. 1988. Mammalian Fertilization. En: The Physiology of Reproduction. Cap. 5, Vol I. edit. Raven Press. New York. p. 135-185

Yeung CH, Nashan D, Sorg C, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E y Cooper TG. 1994. Basal cells of the human epididymis-antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biology of Reproduction* 50: 917-926.

Los integrantes del jurado, designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis titulada “**Análisis macro y micro estructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus***”. El examen se realizó el día 08 de diciembre de 2011.



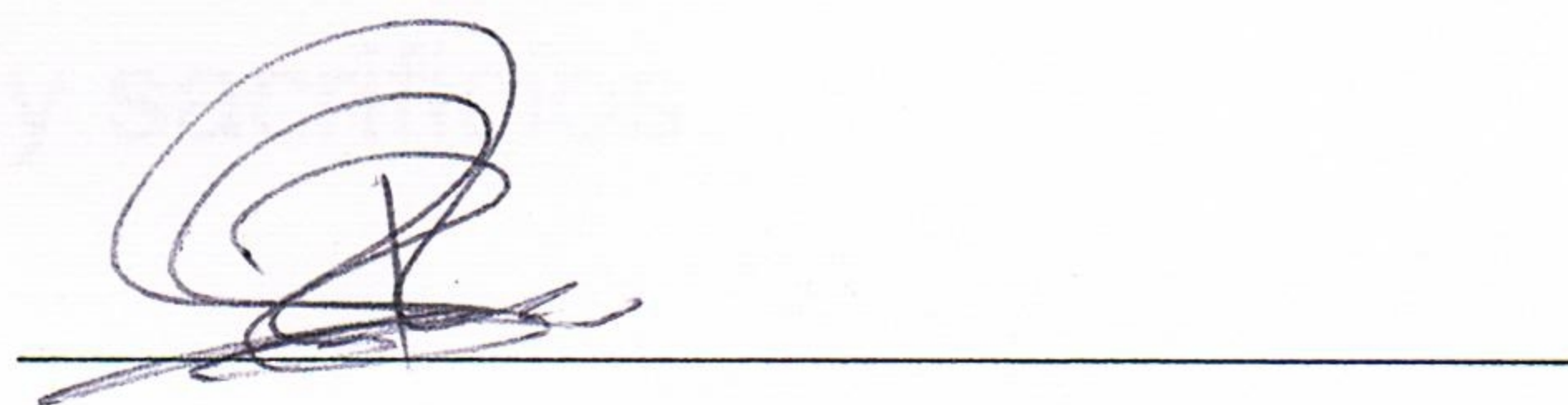
Presidente

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.



Secretario (a)

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM.



Vocal

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
Instituto Nacional de Pediatría, INP.



Vocal

Dra. Edith Arenas Ríos
Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00078

Matrícula: 209381617

ANALISIS MACRO Y MICROESTRUCTURAL DEL EPIDIDIMO EN RELACION CON LA MADURACION Y ALMACENAMIENTO DE ESPERMATOZOIDES EN EL MURCIELAGO ESTACIONAL *Corynorhinus mexicanus*

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 8 del mes de diciembre del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
DRA. EDITH ARENAS RIOS
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR



AHIEZER RODRIGUEZ TOBON
ALUMNO

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

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

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

Aprobar

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

SECRETARIA

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR