



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

“DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD”

“MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL”

“DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE MADURACIÓN
EPIDIDIMARIA EN ESPERMATOZOIDES DE LA LAGARTIJA
Sceloporus siniferus (Sauria: Phrynosomatidae)”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL QUE

PRESENTA:

BIOL. FABIOLA MAGALY RETANA SANDOVAL

Codirectora: Dra. Edith Arenas Ríos

Codirector: Dr. Miguel Ángel León Galván

Asesor: Mtro. Matías Martínez Coronel

Ciudad de México, a 28 de noviembre de 2016

COMITÉ TUTORAL

Codirectora

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I.
editharenas2000@yahoo.com.mx

Codirector

Dr. Miguel Angel León Galván

Departamento de Biología, UAM-I.
león@xanum.uam.mx

Asesor

Mtro. Matías Martínez Coronel

Departamento de Biología, UAM-I.
marti17@hotmail.com

JURADO DE EXAMEN

Mtro. Matías Martínez Coronel
Departamento de Biología, UAM-I.
marti17@hotmail.com

Dra. Reyna C. Fierro Pastrana
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.
reyna@xanum.uam.mx

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón
Instituto de Biotecnología. UNAM
ahiezer@ibt.unam.mx

Dr. Humberto González Márquez.
Departamento de Ciencias de la Salud
hgm@xanum.uam.mx

El programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad de CONACyT registro **003797** y cuenta con apoyo del mismo Consejo.

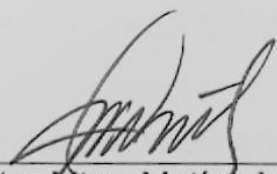
Se agradece a CONACyT la beca otorgada (CVU/Becario): **620477/570239**.

Extiendo un agradecimiento, a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, y a la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, por el financiamiento otorgado durante la participación en los congresos. Así como al proyecto divisional “Ecofisiología de la reproducción de vertebrados” bajo el titular responsable: Dr. Miguel Angel León Galvan, al proyecto “Mecanismos de regulación en las etapas iniciales de la reproducción en mamíferos” bajo la titular responsable: Dra. Edith Arenas Ríos, y al Maestro Matías Martínez Coronel, por los fondos y el apoyo brindado para el desarrollo de esta investigación.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Determinación de indicadores de maduración epididimaria en espermatozoides de la lagartija *Sceloporus siniferus* (sauria: Phrynosomatidae)”, Que presentó: Fabiola Magaly Retana Sandoval.

El día 28 de noviembre del año de 2016.

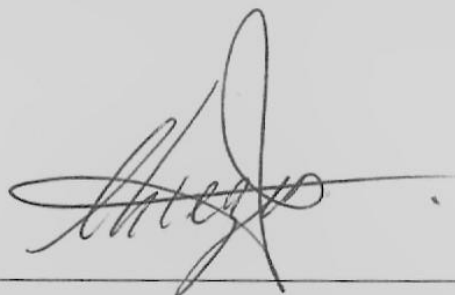
MIEMBROS DEL JURADO



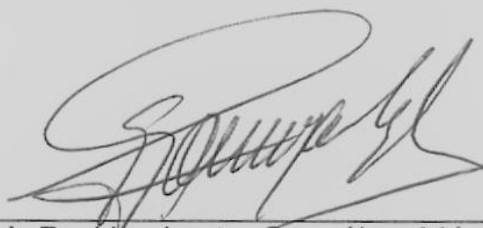
Presidente: Mtro. Matías Martínez Coronel



Secretaria: Dra. Reyna C. Fierro Pastrana



Vocal: Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón



Vocal: Dr. Humberto González Márquez.

Dedicatorias y agradecimientos

Esta tesis está dedicada a todas las personas que durante la realización de este proyecto me han dado su valioso apoyo, principalmente a:

Reina Retana, la mujer más admirable en mi vida que me impulsa a crecer día a día. Gracias madre, por sentar en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación, por tu inmenso amor, tu trabajo y todos los sacrificios que hiciste durante tantos años para costear mis estudios, gracias por confiar en que puedo cumplir todas las metas que me proponga, por apoyarme en mis decisiones profesionales y darme alas para seguir creciendo, gracias por cada uno de los valiosos consejos que me das, por tus regaños y la firmeza con la que me educaste porque así me has enseñado a ser una mejor persona, y sobre todo gracias por demostrarme que eres una mujer llena de fortaleza que hace hasta la imposible por ver feliz a los que más quieres, sin duda alguna eres un gran ejemplo de mujer. Te amo madre.

A **Mauricio Retana**, que a pesar de la distancia siempre ha estado pendiente de mis logros. Gracias hermano por todo el apoyo que me has brindado, por tus consejos y tus múltiples regaños, pero sobre todo por demostrarme que hasta en los momentos y situaciones más tormentosas, siempre es posible sobresalir, tu fortaleza, tu voluntad y tu constancia, son las más grandes cualidades que admiro de ti, realmente me asombra el coraje con el que afrontas cada situación a pesar de lo injusta que sea, más que un hermano eres un padre para mí, te agradezco infinitamente por cuidarme, protegerme y preocuparte por mí durante toda mi vida, gracias por ser un gran ejemplo de perseverancia que muchos deberían seguir.

A mi segunda madre: **mi abuela** Margarita, por procurarse y cuidarme durante toda su vida como una hija más. Gracias mamá por enseñarme a valorar la vida, por tus consejos llenos de experiencia y sabiduría, pero sobre todo gracias por tratarme como tu hija, sabes que para mí nunca serás mi abuela. Te agradezco infinitamente por partirte en mil pedazos para sacar adelante no solo a tus propias hijas, sino a los cinco hijos demás que llegamos a ti, gracias por criarnos y darnos el amor que requeríamos, te agradezco la enorme paciencia que nos tuviste, entiendo que la situación no fue nada fácil, y aun así lograste sacarnos adelante, ahora veinticinco años después, quiero darte las gracias por todo lo que has hecho y dejado de hacer por mí. Te amo mamá.

A **Irene Retana**, mi segunda hermana. Gracias Ire porque para mí eres una verdadera hermana, gracias porque a pesar de que ya no soy una niña te sigues preocupando por mí y me consientes más de lo que deberías, te agradezco la paciencia que siempre me tienes cuando no estoy de buen humor, los ánimos que me das cuando no me siento bien, y tus consejos que me hacen comprender que la vida se debe disfrutar al máximo mientras puedas, cometiendo errores y

levantándote de nuevo sin mira atrás, sin duda alguna esa es tu esencia, lo que hace que te ganes el cariño de todas las personas que te rodean. Por todo tu apoyo, no solo durante este proyecto, sino desde siempre, mil gracias

A **Angel González**, mi amado novio. Gracias amor por acompañarme durante toda mi formación académica y darme tu apoyo siempre que lo necesitaba, gracias por motivarme e impulsarme a seguir adelante en mis momentos de desesperación, y por comprender mis momentos de ausencia durante las intensas jornadas de trabajo, te agradezco de todo corazón tu grata compañía y cada uno de los increíbles momentos que hemos vivido juntos, gracias por estar a mi lado en las buenas y en las malas y por compartir con mi familia no solo los momentos de gozo y felicidad sino también las tristezas. Gracias por todo Angel, te amo.

A los más de treinta integrantes del resto de mi hermosa **familia Retana Sandoval**, gracias a cada uno de ustedes por confiar en mí, por sus motivadoras y esperanzadoras palabras de aliento, que me decían que lograría concluir este proyecto satisfactoriamente. Muchas gracias.

A mi comité tutorial, quienes han tomado el arduo trabajo de transmitirme sus sabios y tan valiosos conocimientos.

A la **Dra. Edith Arenas**, no tengo palabras para agradecerle lo mucho que ha hecho por mí, usted ha sido mi mano derecha y quien me ha guiado en este complicado proyecto, el cual no ha sido nada fácil, sin embargo gracias a su ayuda, esto se ha hecho menos complicado. Le agradezco por ser tan crítica y por hacernos dudar de nosotros mismos, porque la duda es nuestra mejor herramienta para investigar, le agradezco sus palabras de aliento, por demostrarme el potencial que tengo y no dudar de él, por hacerme sentir segura de mi misma, y confiar en mí, usted más que nadie ha visto mi avance a lo largo de los últimos años y no me dejará mentir diciendo que si eh mejorado ha sido principalmente gracias a usted. Sinceramente admiro sus ganas de trabajar, esa capacidad de integración que tiene y su vocación por la investigación, ojala fuera tan fácil encontrar muchos investigadores tan comprometidos como usted que es una excelente investigadora, le agradezco la enorme cantidad de días y horas de trabajo que siempre me dedico, esas horas de calidad que tanto disfrutamos, mis más profundo agradecimiento es para usted doctora por formarme profesionalmente por eso y más, muchas gracias.

Al **Dr. Miguel Angel**, por apoyarme desde la licenciatura en la realización de mis proyectos al igual que en la maestría, gracias por el tiempo que dedico a las dudas que surgieron durante la realización de este proyecto, por ser tan meticuloso y hacerme observaciones tan certeras, le agradezco por confiar en que podía sacar adelante este proyecto y porque gracias a usted conocí a la doctora Edith, quien al igual que usted me ha apoyado durante todo este tiempo. Gracias.

Al maestro **Matías Martínez Coronel**, gracias por su interés y por las aportaciones realizadas a este trabajo, pero principalmente gracias por su trabajo realizado en campo, sin usted este proyecto no habría sido posible, le agradezco también a sus alumnos de licenciatura que colaboraron en las prácticas de campo y son parte de esta tesis, gracias a todos.

A Blanca López y Ahiezer Rodríguez, mis estimados amigos de laboratorio, sin duda alguna, ustedes son uno de los pilares que me ayudo a sacar este trabajo adelante, no tengo palabras para agradecerles sus fuertes críticas y el gran apoyo moral que siempre me han brindado. **Blanca**, te agradezco mucho todo tu apoyo, realmente admiro tu inteligencia, esa gran capacidad que tienes para comprender y retener la información, gracias por ayudarme a comprender muchos de los temas que se me complicaban, no dudo que seas una gran y reconocida investigadora tienes un gran potencial que ni la enfermedad logra vencerte, además de lo académico gracias por tu hermosa y valiosa amistad, por abrirme las puertas de tu casa y de tu familia, te agradezco la confianza y el aprecio que me tienes, los consejos que me das y esas pláticas tan amenas que disfruto tanto, gracias porque sé que en cualquier momento puedo contar contigo. **Ahiezer**, comenzaste siendo mi asesor de servicio social y terminaste siendo un gran amigo, muchas gracias por todos tus consejos y porque tú eres una de las personas por la cuales ahora estoy aquí, junto con la Dra. Edith fueron los que me motivaron a ingresar a esta maestría, gracias por confiar siempre en que puedo hacer las cosas mejor de lo que creo, y sobre todo por la grandiosa amistad que me has brindado, por tus consejos llenos de experiencia y por cada uno de los momentos de convivencia, te aprecio mucho amigo, gracias por todo tu apoyo.

A mis compañeros de laboratorio: Lorena, Ernesto, Ileri, gracias chicos por todos los momentos de risa, y por animarnos mutuamente en los momentos de desesperación en los que queríamos aventarnos del tercer piso porque no nos salían nuestros experimentos, les agradezco todas las aportaciones y observaciones que realizaron a mi trabajo, y por apoyarnos mutuamente en la estandarización de nuestras técnicas, sin duda alguna somos un excelente grupo de trabajo. **Lore**: gracias por ese carisma tan especial y por demostrarme que hasta en los peores momentos de desesperación se puede sonreír, admiro mucho la gran paciencia que tienes para tratar a la gente y para soportar mi humor negro. Gracias. **Ernesto**: gracias por los consejos que solías darme para mejorar mis experimentos y por esas discusiones académicas que nos hacían reflexionar un buen tiempo. Gracias

A mis compañeros de **generación (MBRA 2014-2016)**: Paty, Zaira, Joel, Landa, Jessica, Marcela, Lupita, Cuahutemoc e Ileri, gracias a cada uno de ustedes por hacer tan amenas y constructivas las clases de la maestría, y por esos pocos pero divertidos momentos de convivencia. Principalmente a Paty, por esa bonita amistad que comenzamos a construir, gracias por esas pláticas desestresantes, por la confianza y el aprecio que me tienes, muchas Gracias Pat.

A mis amigos de la carrera principalmente a **Esmeralda Rivera y Carolina González**, gracias por ser parte de cada una de las aventuras vividas durante la Universidad y por su sincera amistad de tantos años. Les agradezco su apoyo y los ánimos que siempre me brindaron durante la maestría.

Esme: tú fuiste la primer pieza del rompecabezas para que llegáramos al laboratorio donde finalizamos juntas la carrera y donde inicie mis estudios de maestría, gracias a ti conocí a los doctores que posteriormente se convirtieron en mis directores, este trabajo también es tuyo amiga, gracias por siempre motivarme a seguir adelante, por tus consejos, tu cariño y la confianza tan sincera de nuestra amistad.

Caro: me has enseñado que en la vida, las cosas más sencillas son las más bonitas; tu sencillez, tu carisma y esa alegría que contagias a todo el mundo son un claro ejemplo de felicidad, gracias por estos años de amistad y por los animos que siempre me has dado para sacar adelante mis proyectos.

Agradezco a todas aquellas personas que participaron en la realización de este proyecto, en especial a:

A la **Dra. Reina Fierro Pastrana** y al **Dr. Humberto González Márquez**, por su participación y el tiempo que dedicaron a revisar esta tesis, por sus comentarios y observaciones tan acertadas, les agradezco mucho por favorecer a las mejoras de este trabajo. Gracias

Al **Dr. Martín Martínez Torres**, por la calurosa estancia que me brindo en el laboratorio de Biología de la Reproducción, Unidad de Morfología y Función, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Gracias por sus enriquecedores conocimientos, por el entusiasmo con el que me impartía clases, por mostrar tanto interés en mi proyecto y por las aportaciones que me brindo. Gracias.

A la maestra **Carmen Álvarez Rodríguez** y a la maestra **Beatriz Rubio Morales** de la FES Iztacala, por el tiempo que me brindaron durante mi estancia en la UNAM, gracias por los conocimientos tan valiosos que me enseñaron y porque fuera de lo académico me brindaron su confianza y su amistad, muchas gracias.

A los chicos del **laboratorio de Biología de la Reproducción, Unidad de Morfología y Función, de la FES Iztacala**, por hacerme sentir parte de su grupo de trabajo, por las convivencias a las que siempre me incluyeron y por su amistad. Gracias.

A la **Dra. Edith Cortés Barberena**, por todo su apoyo durante la realización de este trabajo, gracias por el tiempo y las horas que me dedico en el citómetro. Y a **Lorena Vadillo**, por su tiempo y su interés en instruirme a manipular el microscopio de contraste de fases. Gracias

A cada uno de ustedes muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatorias y agradecimientos.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estructura y función del epidídimo	1
1.2 Maduración espermática epididimaria.....	2
1.3 Modificaciones postraduccionales en glicoproteínas como indicadores de la maduración espermática epididimaria.....	3
1.4 Determinación de fosforilación de los residuos de tirosinas de las proteínas.....	5
2 ANTECEDENTES.....	7
2.1 Estructura del epidídimo en reptiles	7
2.2 Maduración epididimaria en reptiles	9
2.3 La lagartija <i>Sceloporus siniferus</i> como modelo para determinar maduración espermática epididimaria en reptiles lacertílicos	13
3 JUSTIFICACIÓN.....	15
4 OBJETIVO GENERAL.....	16
5 OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
6 HIPÓTESIS.....	17
7 MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1 Reactivos	17
7.2 Soluciones.....	17
7.3 Captura y selección de ejemplares de <i>Sceloporus siniferus</i>	17
7.4 Criterios de inclusión de los organismos de estudio.	18
7.5 Obtención y procesamiento de espermatozoides.	18
7.6 Evaluación de espermatozoides.....	20
7.7 Detección y patrón de distribución de carbohidratos de la membrana plasmática.	22
7.8 Detección y patrón de distribución de fosforilación de residuos de tirosina.....	23

7.9	Análisis estadístico de resultados.....	23
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
8.1	Características morfológicas y sexuales de los ejemplares <i>Sceloporus siniferus</i> de estudio 24	
8.2	Análisis de los espermatozoides testiculares y epididimarios de <i>S. siniferus</i>	29
8.3	Concentración espermática.....	29
8.4	Movilidad espermática.....	31
8.5	Gota citoplasmática	34
8.6	Distribución de carbohidratos	39
8.7	Fosforilación en residuos de tirosinas	49
9	CONCLUSIONES.....	54
10	PERSPECTIVAS.....	55
11	BIBLIOGRAFÍA	56

RESUMEN

La maduración espermática epididimaria es el proceso de los espermatozoides de mamíferos, en el que adquieren su capacidad de fertilizar al óvulo después de su tránsito por el epidídimo. Este tránsito no es pasivo, los espermatozoides sufren cambios morfofisiológicos y bioquímicos, que son responsables de la adquisición de las características necesarias para fertilizar. Durante muchas décadas se consideró que en los reptiles el proceso de maduración espermática epididimaria no se llevaba a cabo. Existen trabajos muy puntuales en lagartijas, donde se encontró que, en algunas de ellas, la maduración parece ocurrir y puede ser determinante para que el espermatozoide fertilice. En este trabajo se utilizó como modelo a la lagartija ovípara *Sceloporus siniferus* (Cope, 1870), o lagartija espinosa, del orden Squamata, familia Phrynosomatidae. Esta presenta un patrón reproductivo estacional de marzo a julio. Los cambios que ocurren en los espermatozoides durante el tránsito por el epidídimo de esta lagartija no se han descrito, por lo que, en este trabajo se estudiaron los cambios en la fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas y en la distribución de los carbohidratos de la membrana de los espermatozoides de *S. siniferus* durante su tránsito epididimario, para determinar su posible relación el proceso de maduración espermática epididimaria. Debido a la poca existencia de investigaciones realizadas en la especie, para determinar el momento exacto de presencia de espermatozoides, fue necesario capturar organismos mensualmente. Se observó que, los testículos y epidídimos de *S. siniferus* incrementan su tamaño debido a la presencia de espermatozoides de abril a septiembre y de mayo a septiembre respectivamente. Con el fin de corroborar el estado funcional de los espermatozoides, se determinó evaluando la proporción de movilidad de espermatozoides extraídos de testículo y de cada una de las regiones del epidídimo (caput, corpus y cauda). Se determinó la maduración, analizando los cambios en la distribución de carbohidratos en la membrana plasmática de las células, además, de los cambios en la fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas. Se observó los espermatozoides epididimarios del caput del epidídimo, mostraron menos de 2 por ciento de

movilidad espermática, mientras que a partir del corpus del epidídimo, los espermatozoides mostraron un aumento significativo de movilidad, que siguió aumentando en los espermatozoides de la cauda. Además de la movilidad espermática, en los carbohidratos N-acetil glucosamina y/o ácido siálico, principalmente a lo largo de todo el espermatozoide, también se observó un aumento a partir de la región del corpus del epidídimo durante los meses de reproducción (mayo-julio), lo que también se corroboró por citometría de flujo. No se detectó la presencia de fucosa en espermatozoides de ninguna de las regiones evaluadas en microscopía de fluorescencia, sin embargo, por citometría de flujo se logró detectar su presencia en cantidades menores respecto al resto de los carbohidratos analizados, incrementándose (no significativamente) a partir del corpus del epidídimo. La fosforilación de residuos de tirosina se observó en el espermatozoide completo, en la cabeza y en la región acrosomal, esta mostró un aumento cuando los espermatozoides fueron obtenidos del corpus. El incremento en la cantidad de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico y la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas, se relacionó con un incremento en la movilidad espermática a partir de dicha región. Las evidencias bioquímicas obtenidas en el presente estudio permiten concluir que se producen cambios en los espermatozoides de la lagartija *Sceloporus siniferus* que podrían considerarse como un proceso de maduración espermática epididimaria.

ABSTRACT

Epididymal sperm maturation is the process of mammalian spermatozoa, in which they acquire their ability to fertilize the egg after its transit through the epididymis. This transit is not passive, the spermatozooids undergo morphophysiological and biochemical changes, which are responsible for acquiring the characteristics necessary to fertilize. For many decades it was considered that in the reptiles the epididymal sperm maturation process was not carried out. There are very specific works in lizards, where it was found that, in some of them, maturation seems to occur and can be determinant for sperm to fertilize. In this work the oviparous lizard *Sceloporus siniferus* (Cope, 1870), or spiny lizard, of the order Squamata, family Phrynosomatidae, was used as model. This shows a seasonal reproductive pattern from March to July. The changes that occur in the spermatozoa during transit through the epididymis of this lizard have not been described, therefore, in this work we studied the changes in the phosphorylation of the tyrosine residues of proteins and in the distribution of carbohydrates of the membrane of the spermatozoa of *S. siniferus* during their epididymal transit, to determine their possible relation the process of epididymal spermatid maturation. Due to the lack of research carried out on the species, to determine the exact moment of sperm presence, it was necessary to capture organisms monthly. It was observed that, the testes and epididymides of *S. siniferus* increase their size due to the presence of spermatozoa from April to September and from May to September respectively. In order to corroborate the functional status of spermatozoa, it was determined by evaluating the proportion of sperm motility extracted from the testis and from each region of the epididymis (caput, corpus and caudal). The maturation was determined by analyzing the changes in the carbohydrate distribution in the plasma membrane of the cells, in addition to the changes in the phosphorylation of the tyrosine residues of the proteins. Epididymal spermatozoa from the caput of the epididymis were observed, showing less than 2 percent of sperm motility, whereas from the corpus of the epididymis, spermatozoa showed a significant increase in mobility, which continued to increase in the spermatozoa of the cauda. In addition to sperm motility, in the N-acetyl glucosamine and / or sialic acid

carbohydrates, mainly throughout the sperm, an increase was also observed from the corpus region of the epididymis during the months of reproduction (May- July), which was also corroborated by flow cytometry. It was not detected the presence of fucose in spermatozoa of any of the evaluated regions in fluorescence microscopy, however, by means of flow cytometry it was possible to detect its presence in smaller quantities with respect to the rest of the analyzed carbohydrates, increasing (not significantly) from of the corpus of the epididymis. Phosphorylation of tyrosine residues was observed in the whole sperm, in the head and in the acrosomal region, this showed an increase when the spermatozoa were obtained from the corpus. The increase in the amount of N-acetylglucosamine and / or sialic acid and protein phosphorylation in tyrosine residues was associated with an increase in sperm motility from that region. The biochemical evidence obtained in the present study allows us to conclude that there are changes in the spermatozoa of the lizard *Sceloporus siniferus* that could be considered as a process of epididymal spermatid maturation.

1 INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, los espermatozoides que son producidos en los testículos, particularmente dentro de los túbulos seminíferos, no son capaces de fertilizar al ovocito, si no que dependen del paso a través del epidídimo en donde sufrirán una serie de modificaciones para adquirir la capacidad de fertilización una vez que se encuentren en el tracto reproductor femenino (Cooper, 1999; Robaire *et al.*, 2006). Al proceso por el cual el espermatozoide adquiere el potencial fertilizante se le conoce como *maduración espermática epididimaria* (Cooper, 1998; Lewis y Aitken, 2001; Cooper, 2007) y, en mamíferos, generalmente ocurre antes de que los espermatozoides ingresen a la región caudal del epidídimo (Robaire *et al.*, 2006). Esta es una regla que tiene excepciones ya que, al menos en una especie de murciélago, el proceso de maduración continúa aún en la región caudal (Rodríguez-Tobón *et al.* 2015). En reptiles, no se ha descrito si el proceso de maduración epididimaria ocurre en los miembros del grupo, por lo que el presente estudio tuvo la finalidad de caracterizar la distribución de algunos carbohidratos en la membrana plasmática y la fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas del espermatozoide, durante su recorrido por el ducto epididimario en la lagartija *Sceloporus siniferus*, para determinar su posible relación con el proceso de maduración espermática.

1.1 Estructura y función del epidídimo

El conducto epididimario es un túbulo muy contorneado que varía en longitud, 1 m en ratones (Takano *et al.*, 1981), 3 m en ratas (Turner *et al.*, 1990), 3 a 6 m en seres humanos (Von y Neuhauser, 1964), y hasta 80 m en caballos (Maneely, 1959). En mamíferos, el epidídimo, se ha regionalizado dependiendo del tipo de células que conforman el epitelio tubular a lo largo del órgano (células principales, apicales, basales, halo, estrechas y claras) y, generalmente se reconocen tres regiones anatómicas: 1) caput, región a través de la cual se transportan los espermatozoides y comienza la maduración de los espermatozoides; 2) corpus, región donde ocurre la maduración de los espermatozoides y 3) cauda, región

donde se congregan y almacenan los espermatozoides; en algunas especies, está diferenciado un segmento inicial que se incorpora en el caput, este recibe a los espermatozoides, y el fluido proveniente del testículo y vasos eferentes, (Cooper, 1998; Eddy, 2006; Robaire *et al.*, 2006; Setchell y Breed, 2006; Sullivan *et al.*, 2007).

Cada región del epidídimo tiene un papel fundamental en el control e inducción de la maduración y almacenamiento de los espermatozoides. (Fouchecourt *et al.*, 2000; Belleanne *et al.*, 2011a; Belleanne *et al.*, 2011b; Dacheux *et al.*, 2012). Las células epiteliales expresan genes diferentes y sintetizan diversas proteínas que, junto con otras sustancias que son liberadas al lumen, establecen las características microambientales particulares y, cuando los espermatozoides recorren el túbulo, se encontrarán en contacto directo con ese microambiente luminal específico, ocasionando modificaciones bioquímicas en estos (Turner *et al.*, 2003; Robaire *et al.*, 2006; Aitken *et al.*, 2007).

1.2 Maduración espermática epididimaria

El espermatozoide es el resultado de una serie de modificaciones morfológicas y bioquímicas que le ocurren a las células germinales, durante su recorrido por el tracto reproductor masculino, iniciando desde su formación en los túbulos seminíferos dentro de los testículos, proceso conocido como espermatogénesis, esto involucra varias fases: 1) proliferación de las espermatogonias; 2) proliferación de los espermatocitos; 3) reducción genómica de espermatocitos diploides a espermátidas haploides, y 4) metamorfosis de las espermátidas redondas hasta cambiar a una célula larga, delgada e hidrodinámica, con núcleo muy condensado y flagelo, necesario para la movilidad; esta última fase es conocida como espermiogénesis (De Kretser *et al.*, 1998; Millete, 1999; Muciaccia *et al.*, 2013; Divya *et al.*, 2014). Una vez liberados a la luz de los túbulos seminíferos, los espermatozoides iniciarán su trayecto para ingresar al conducto epididimario, en donde se llevará a cabo el proceso de maduración espermática.

Se sabe que las moléculas que forman parte del epidídimo, modifican los espermatozoides durante su tránsito por este órgano, propiciando: a) aumento en la carga negativa de la membrana plasmática; b) pérdida de la gota

citoplasmática; c) cambio en el coeficiente fosfolípidos/colesterol; d) reestructuración o remodelación de la forma del acrosoma; e) disminución del diámetro de las mitocondrias; e f) incremento del movimiento progresivo (Hernández y Rosado, 1988; Awano *et al.*, 1993; Tash y Bracho, 1994; Parks y Hammerstedt, 1985; Huang *et al.*, 1999; Legare *et al.*, 2001; Lewis y Aitken, 2001; Vernet *et al.*, 2001; Ecroyd *et al.*, 2004; Naz y Rajesh, 2004; Sidhu *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2007; Fabrega *et al.*, 2011). En conjunto, estos cambios confieren a los espermatozoides la posibilidad de llevar a cabo la reacción acrosomal y fecundar al óvulo (Lewis y Aitken, 2001; Ecroyd *et al.*, 2004; Naz y Rajesh, 2004; Sidhu *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2007; Fabrega *et al.*, 2011).

1.3 Modificaciones postraduccionales en glicoproteínas como indicadores de la maduración espermática epididimaria

La membrana plasmática del espermatozoide está recubierta con proteínas y otras moléculas como residuos de carbohidratos; cuando los espermatozoides dejan el testículo y pasan por el conducto epididimario, éstas pueden ser absorbidas por las células del epitelio, o bien, alterarse, perderse y/o reemplazarse por otras que se integran a la membrana plasmática (Eddy, 2006). El glicocálix contiene cadenas de oligosacáridos unidos covalentemente a las proteínas integrales de membrana plasmática (glicoproteínas) o a los lípidos (glicolípidos), así como cadenas de polisacáridos unidos covalentemente a una proteína central (proteoglicanos) (Alberts *et al.*, 1994; Pelaez y Long, 2007).

En general, la función del glicocalix es mediar los eventos de reconocimiento específicos y/o proporcionar la modulación de procesos biológicos (Varki, 1993; Pelaez y Long, 2007), además de ser muy heterogéneo y extremadamente complejo en su composición y organización, los componentes que lo conforman son dinámicos, ya que los carbohidratos que la conforman, se mantienen en cambio constante durante el tránsito por el epidídimo y, posteriormente, durante el tránsito por el tracto reproductor femenino (Eddy, 2006), representando una interfaz principal entre el gameto masculino y su entorno, participando en la inmunoprotección de la misma célula, la adquisición de la capacidad de

fertilizante, la reacción acrosomal y las interacciones con el óvulo (Schröter *et al.*, 1999; Diekman, 2003; (Pelaez y Long, 2007).

Para caracterizar los tipos de residuos de azúcares que comprenden el glicocáliz de la membrana plasmática de los espermatozoides, se han empleado frecuentemente lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las lectinas son proteínas de origen vegetal o animal, que se fijan a carbohidratos específicos en la membrana plasmática, y han sido utilizadas para la localización de residuos de carbohidratos en muchas poblaciones celulares (Desantis *et al.*, 2002), además de que permiten evaluar el estatus funcional de los espermatozoides, determinando su cantidad y distribución (Damjanov, 1987; Flesch *et al.*, 1998; Vázquez *et al.*, 1996).

Se han realizado estudios que utilizan lectinas, como la aglutinina de *Triticum vulgare* (WGA), conjugada a FITC (WGA-FITC), que se une específicamente a residuos de ácido siálico y de N-acetilglucosamina, para analizar las diferentes modificaciones bioquímicas que ocurren en la superficie de la membrana del espermatozoide (Fierro *et al.*, 1996).

En varias especies de mamíferos (rata, ratón, conejo, hámster, mono Rhesus), se ha encontrado una gran cantidad de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la región del acrosoma, el cual va incrementando conforme el espermatozoide recorre el túbulo epididimario (Kumar *et al.*, 1990; Navaneetham *et al.*, 1996). Se sabe que los residuos de fucosa intervienen de manera importante en la interacción entre el óvulo y el espermatozoide (Boldt *et al.*, 1988, 1989). En espermatozoides de humano se encontró que aumentan los residuos de manosa al inducir la reacción acrosomal, lo que sugiere que la expresión de estos residuos se relaciona con su potencial fertilizante (Fierro *et al.*, 1996). Estos estudios han demostrado que varios de los carbohidratos de la membrana del espermatozoide, son necesarios para permitir la unión entre el espermatozoide y el óvulo, así como la reacción acrosomal (Jiménez *et al.*, 2003).

La función de los carbohidratos cada vez es más clara, debido a la importancia que tienen en la mediación de la adhesión entre el espermatozoide y la zona pelúcida (Chandra *et al.*, 2008), por lo que se ha determinado que esta

glicosilación, se encuentra relacionada con el proceso de maduración espermática epididimaria (Toyonaga *et al.*, 2011). Otra característica asociada con la maduración del espermatozoide, es el incremento general en la carga negativa de la superficie de la membrana plasmática (Holt, 1980; Eddy *et al.*, 1985), resultado de la incorporación de ácido siálico proveniente de las células epiteliales del epidídimo, o de antígenos que incrementan la acidez del medio en el que se encuentran (Bedford, 1993).

La glicosilación de las proteínas, es una de las modificaciones postraduccionales más importantes de la superficie del espermatozoide, involucrando varias modificaciones bioquímicas intra y extracelulares (Tulsiani, 2006; Chandra *et al.*, 2008), que a su vez, están implicadas en la activación de varias tirosin cinasas que participan en las vías de señalización que activan la movilidad de los espermatozoides (Wassler, 2013), proceso íntimamente relacionado con la maduración del espermatozoide.

1.4 Determinación de fosforilación de los residuos de tirosinas de las proteínas

La fosforilación de las proteínas es un evento postraducciona que le permite a la célula controlar procesos, como su crecimiento, ciclo celular, ensamble del citoesqueleto y modulación de transporte de iones, ya que es uno de los mecanismos más importantes para la regulación de la actividad biológica (Tardif *et al.*, 2001; Urner y Sakkas, 2003; Naz y Rajesh, 2004). El estado de fosforilación es controlado por la actividad de las enzimas proteína cinasas y fosfatasas. Las cinasas son las encargadas de fosforilar a otras proteínas, ésta es la adición de un grupo fosfato a un grupo funcional -OH en un residuo de aminoácido dentro de una proteína, mientras que las fosfatasas, son las enzimas encargadas de remover a estos grupos fosfato (Tardif *et al.*, 2001; Urner y Sakkas, 2003; Naz y Rajesh, 2004).

En las células eucariotas, uno de los mecanismos más comunes para regular la actividad proteica es la adición y/o eliminación de grupos fosfato a partir de

residuos de serina, treonina o tirosina (Naz y Rajesh, 2004). La fosforilación de los residuos de tirosina en las proteínas, surgió como un mecanismo de transducción de señales en todas las células eucariotas (Thomas y Brugge, 1997; Grangeasse *et al.*, 2007; Pincus *et al.*, 2008; Takashi *et al.*, 2012), pero en los espermatozoides se correlaciona con la maduración espermática (Tardif *et al.*, 2001; Naz y Rajesh, 2004), ya que se ha determinado que los eventos de fosforilación y desfosforilación funcionan como interruptores “on/off” para el espermatozoide y regulan, principalmente, las proteínas flagelares implicadas en la movilidad (White y Aitken, 1989; Yeung *et al.*, 1999; Vijayaraghavan *et al.*, 2000; Lewis y Aitken 2001; Naz y Rajesh 2004; Contri *et al.*, 2012; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015), proceso que se relaciona directamente con la maduración espermática.

La enzima adenilato ciclasa es la mediadora inicial para que se active la cascada de señalización de la fosforilación de residuos de tirosina, ya que incrementa el nivel de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que es un segundo mensajero en todos los tipos celulares, que activa a la cinasa de proteínas A (PKA) (Tardif *et al.*, 2001; Lewis y Aitken, 2001; Naz y Rajesh, 2004; Lin *et al.*, 2006). La PKA regula la fosforilación de proteínas en residuos de Serina/Treonina e indirectamente activa a la cinasa de proteínas T (PKT), que fosforila exclusivamente residuos de tirosina (Leclerc *et al.*, 1996).

Parece ser que la regulación de la fosforilación de los residuos de tirosina en los espermatozoides maduros de mamífero, es a través de AMPc / proteína cinasa A (PKA), vía que parece ser única, mientras que la fosforilación de residuos de tirosina durante la capacitación se ha observado en muchas especies (Lewis y Aitken, 2001). El colesterol, iones bicarbonato (HCO_3^-), especies reactivas de oxígeno (ERO), progesterona, ácido gamma-aminobutírico, entre otras, pueden desencadenar la fosforilación de proteínas (Baldi *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 2004; Naz y Rajesh, 2004; Chabory *et al.*, 2010). Parece ser que las ERO activan la señalización de la fosforilación de residuos de tirosina; sin embargo, el papel de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias espermáticas sigue siendo controvertido en la activación de la fosforilación (Takashi *et al.*, 2012). También se ha sugerido que la fosforilación de residuos de tirosina puede estar conectada con

el proceso de fusión con la membrana de los ovocitos durante la fertilización (Takashi *et al.*, 2012).

Para investigar la importancia de la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas durante la maduración del epidídimo, la mayoría de los análisis se realizan empleando anticuerpos antifosfotirosina (Takashi *et al.*, 2012). Este tipo de estudios, no se han realizado en espermatozoides de reptiles, por lo que no se sabe cuáles son los cambios de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas de los espermatozoides, a través de su paso no solo por el epidídimo, sino por el sistema excurrente del aparato reproductor de los reptiles, aunque se cree que pudieran ser parecido a mamíferos (Ravet, *et al.*, 1987), para determinar dichos cambios fue de gran interés para nuestro grupo, investigar lo que ocurre en espermatozoides epididimarios de una especie de lagartija.

2 ANTECEDENTES

2.1 Estructura del epidídimo en reptiles

Las descripciones de la estructura epididimaria en reptiles son escasas; en reptiles como el lacertilio *Lacerta vivípara* (Depeiges y Dacheux 1985) y *Hemidactylus flaviviridis* (Haider y Rai 1987), el epidídimo, se divide en tres regiones, anterior, media y posterior, comparables con las descritas en mamíferos; sin embargo, se presentan muchos cambios histológicos entre regiones (Nirmal y Rai, 1997). Contrariamente, los resultados reportados por Haider y Rai (1987) y Jones (1998, 2002), señalan que el epidídimo del lagarto *H. flaviviridis*, tiene cuatro regiones estructuralmente distintas (Fig. 1) (Akbarsha *et al.*, 2006).

El epidídimo de los reptiles está formado por un epitelio pseudoestratificado que consiste de células principales, células basales, y probablemente linfocitos intra-epiteliales (Jones 1998, 2002; Akbarsha *et al.*, 2006). Sin embargo, Jones (1998, 2002), señala que no hay evidencia definitiva de la presencia de un segmento inicial en el epidídimo de los reptiles (Jones, 1998, 2002; Akbarsha *et al.*, 2006).

Por otra parte, en la lagartija *Podarcis sicula* (o *Lacerta sicula*) Desantis *et al.*, (2002) reportan que el epidídimo se divide en tres regiones, caput, corpus y cauda, y que el epitelio se compone sólo de dos tipos de células, secretoras y basales (Akbarsha *et al.*, 2006). De igual forma, en el cocodrilo, *Caiman crocodilus*, sólo se reconocen dos tipos de células, ambas columnares, una con núcleo apical y otra con núcleo basal, únicamente en el segmento proximal (Guerrero *et al.*, 2004; Akbarsha *et al.*, 2006).

Para el caso de la tortuga *Chrysemys picta*, las células que comprenden el epitelio pseudoestratificado del epidídimo consisten en células vesiculares (comparables a las células principales), células basales, células estrechas y células ricas en mitocondrias (Holmes y Gist 2004; Akbarsha *et al.*, 2006). En *Lacerta vivípara*, el epitelio del epidídimo está constituido por células cúbicas no secretoras, las que, después de varias divisiones celulares y de su crecimiento, se vuelven secretoras, reportando la actividad secretora más alta, cuando los espermatozoides entran en el conducto (Ravet *et al.*, 1991).

Uno de los estudios más recientes sobre la estructura del epidídimo, se realizó en el lagarto *Sitana ponticeriana*; en esta especie, el epidídimo se diferencia en cuatro zonas histológicamente distintas: segmento inicial, caput, corpus y cauda. Las tres primeras zonas parecen estar asociados con la secreción y la absorción/endocitosis, mientras que la cauda parece estar involucrada con la absorción/endocitosis y almacenamiento. El epitelio de este lagarto se compone de seis tipos diferentes de células: principales, estrechas, apicales, claras, basales y leucocitos intraepiteliales (comparable a las células halo), como en los mamíferos. Las células principales, basales y los leucocitos intraepiteliales se encuentran a lo largo de toda la longitud, mientras que las células estrechas y apicales se limitan al segmento inicial y las células claras solamente se producen en la cauda (Akbarsha *et al.*, 2006). La histología del epidídimo en reptiles es muy variable, por lo que no es posible concluir una función fisiológica única para este órgano en este grupo, sino que las células que forman parte del epitelio epididimario le confieren más capacidades, tales como el almacenamiento prolongado de espermatozoides (Akbarsha *et al.*, 2006), y posiblemente un papel significativo en la maduración espermática.

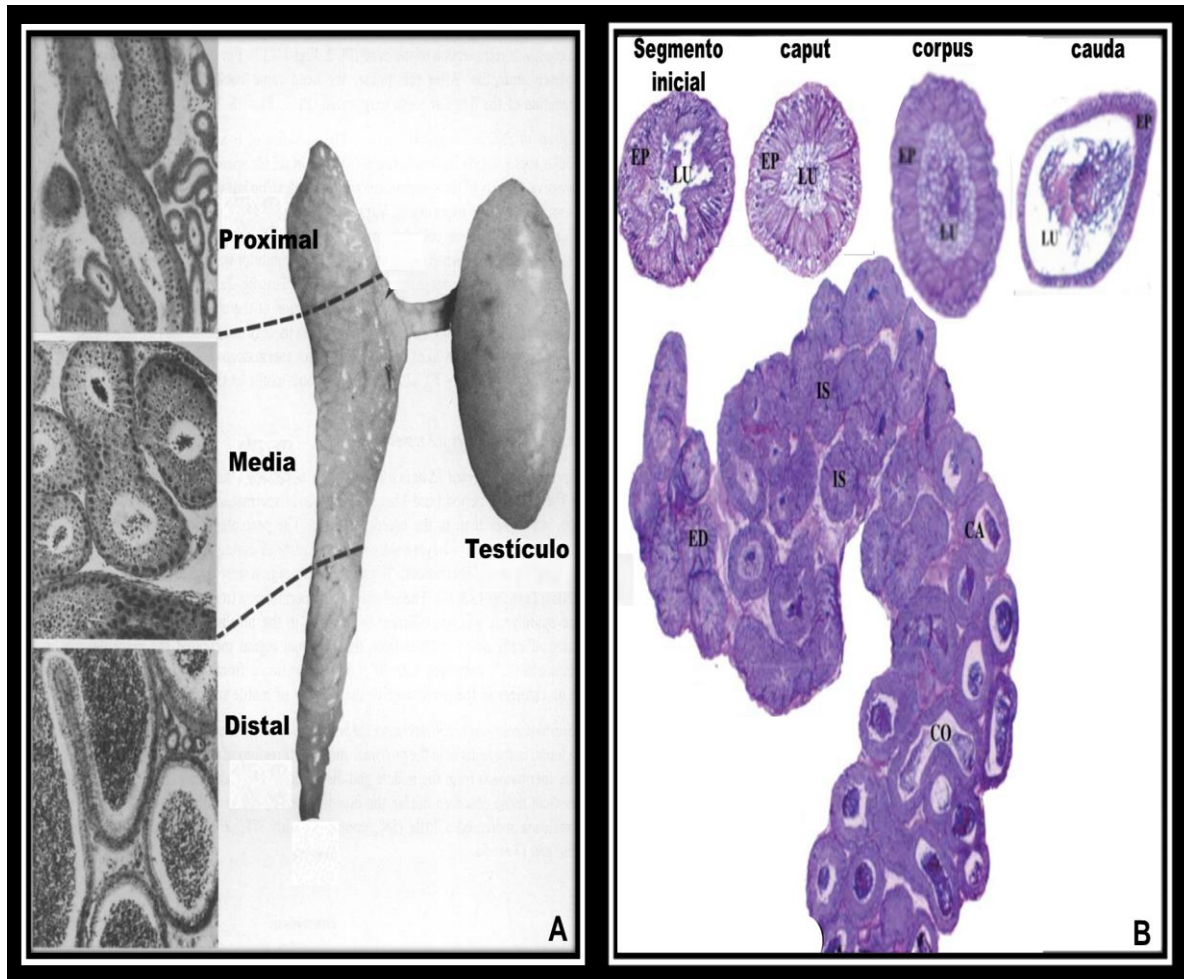


Figura 1. A. Regiones anatómicas e histológicas del epidídimo del lagarto *Lacerta vivípara* (Fotos modificadas de Depeiges y Dacheux, 1985) **B.** Sección longitudinal de la porción anterior del epidídimo de *Sitana ponticeriana*, mostrando conductos eferentes intraepididimales (ED); segmento inicial (IS), caput (CA) y corpus (CO) del epidídimo. Parte superior, secciones transversales del epidídimo (segmento inicial, caput, corpus y cauda), donde EP: epitelio y LU: lumen. (Fotos modificadas de Akbarsha *et al.*, 2006).

2.2 Maduración epididimaria en reptiles

Existen pocos trabajos científicos realizados en otros vertebrados no mamíferos, en los que se reportan datos que indiquen la existencia de cambios subcelulares en los espermatozoides en relación al proceso de maduración espermática epididimaria (Depeiges y Dacheux 1985). En el caso de las aves, en reptiles y ciertas especies de peces, la información existente parece indicar que si ocurren

cambios pos testiculares en los espermatozoides asociados a una maduración (Esponda, 1991). Mientras que en vertebrados inferiores como anfibios anuros y en peces teleósteos y ciclostomados, los datos parecen indicar que este proceso maduracional de los espermatozoides no se presenta, ya que una vez que los espermatozoides son liberados del epitelio seminífero y abandonan el testículo, son totalmente móviles y fértiles (Depeiges y Dacheaux, 1985).

Debido a su posición evolutiva y a su forma de reproducción, se ha mencionado que en los monotremas (ornitorrinco y equidna), la maduración de los espermatozoides en el epidídimo es mucho menos compleja que en otros mamíferos (Nixon *et al.*, 2011). Sin embargo, una característica única del epidídimo del monotrema, reside en su capacidad para promover la formación de conjuntos de espermatozoides que sirven para mejorar su movilidad. Lo que sugiere que, esta estrategia de cooperación celular, representa una forma temprana de la maduración del epidídimo que apareció durante la evolución de los mamíferos superiores, posiblemente como una adaptación para la competencia espermática (Nixon *et al.*, 2011).

La adquisición de proteínas secretadas por el epidídimo sobre la superficie de los espermatozoides, parece ser un fenómeno presente en todas las especies de vertebrados que se han investigado hasta la fecha (Nixon *et al.*, 2011). El uso de anticuerpos específicos que determinan proteínas secretadas por parte del conducto epididimario, ha mostrado que los espermatozoides de aves y reptiles, al igual que los de mamíferos, incorporan proteínas durante su paso a través de él (Esponda, 1991). De hecho, las estrategias de inmunomarcaje han proporcionado pruebas de que el proceso de maduración en el epidídimo parece menos crítico para lograr la fertilidad en especies como aves y reptiles (Esponda y Bedford, 1985, 1987; Morris *et al.*, 1987; Esponda, 1991). Por lo que se plantea que las proteínas adquiridas durante la maduración en esas especies tendrían funciones diferentes a las de los mamíferos, probablemente los componentes adquiridos en este conducto pueden influir en otros aspectos como el transporte y/o la supervivencia de los espermatozoides en el tracto de la hembra (Esponda, 1991; Nixon *et al.*, 2011).

Por otra parte, en el lagarto *Lacerta vivipara* (Gigon-Depeiges y Dufaure, 1977; Depeiges *et al.*, 1981), el epitelio del epidídimo secreta grandes gránulos secretorios durante la época de cría, bajo el control de testosterona, que se vacían y se mezclan con los espermatozoides durante el período reproductivo (Depeiges y Dufaure, 1983; Depeiges y Dacheux 1985). Las variaciones de testosterona en plasma y en el epidídimo de *L. vivipara* (Courty y Dufaure, 1982; Dufaure *et al.*, 1986), sugieren que estos cambios están relacionados con modificaciones importantes en la morfología y la función del epidídimo.

Courty y Dufaure, (1982) y Dufaure *et al.*, (1986), mencionan la aparición secuencial de proteínas "L" en el epidídimo de *L. vivipara* durante el ciclo reproductivo, la cual podría estar relacionada con la modificación de características estructurales de las células epiteliales entre el inicio de la etapa de secreción y la de hipersecreción (Ravet, *et al.*, 1987; Ravet, *et al.*, 1991). Esta proteína que es capaz de unirse fuertemente a la cabeza de los espermatozoides, no se separó fácilmente con lavados de NaCl, por lo que podría desempeñar un papel importante en la fisiología de los espermatozoides (Depeiges y Dufaure 1983); también demostraron que los espermatozoides del epidídimo muestran una señal fluorescente importante en la región de la cabeza, mientras que las piezas intermedias y los flagelos son negativos, lo que indica la unión específica de la proteína L a la superficie de la cabeza del espermatozoide. Los espermatozoides de los testículos, negativos a proteína L, mostraron señal positiva después de su paso por el epidídimo (caput, corpus y cauda), lo que demuestra que la proteína fue adquirida inmediatamente al entrar a la región del caput (Depeiges y Dufaure 1983).

Por otra parte, Depeiges y Dacheux (1985), mencionan que, en la lagartija *Lacerta vivipara*, la adición de cafeína induce la movilidad progresiva en espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, mientras que, en espermatozoides testiculares, no tuvo ningún efecto, de la misma forma que en mamíferos la cafeína induce movilidad espermática en reptiles (Depeiges y Dacheux, 1985).

En los mamíferos, las proteínas del epidídimo que interfieren con los espermatozoides están glicosiladas (Depeiges y Dufaure 1983). En *L. vivipara*, las vacuolas periféricas de los gránulos de secreción en el epitelio del epidídimo contienen restos de carbohidratos, lo cual fue demostrado por tinción con la lectina *Pisum sativum* que se une a residuos de manosa (Gigon-Depeiges y Dufaure, 1977) y con la lectina *Lens esculenta* que se une a N-acetil glucosamina y D-glucosa (Depeiges y Dufaure, 1981b; Depeiges y Dufaure 1983). Por lo que se pensaría que los carbohidratos también juegan un papel muy importante en los cambios bioquímicos que sufre el espermatozoide, relacionados con la maduración espermática.

Se ha reportado en reptiles, al igual que en mamíferos, que después de que los espermatozoides abandonan los testículos, al entrar al conducto epididimario, sufren algunos cambios que provocan que los espermatozoides adquieran el potencial para moverse una vez extraídos del epidídimo. Estos estudios han sido realizados a nivel de la *rete testis* y conductos eferentes en la tortuga *Chrysemys picta*, demostrando que las células que conforman dichas partes del sistema excurrente, secretan sustancias que favorecen la movilidad de los espermatozoides para que estos pasen al epidídimo (Holmes y Gist, 2004).

En otros estudios realizados en lacertilios, se ha observado que los iones son constituyentes importantes en el fluido epididimal y exhiben una variación de concentración en las diferentes regiones del epidídimo, influenciando la movilidad de los espermatozoides (Wong *et al.*, 1981; Breitbat 1995). En la lagartija *Mabuya carinata*, se reporta que las concentraciones de cationes, están relacionadas con el aumento de la movilidad, encontrándose mayor movilidad cuando las concentraciones de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} aumenta de la región proximal a la región distal del epidídimo (Aranha *et al.*, 2008).

En el gecko *Hemidactylus flaviviridis*, aumentar el volumen del fluido del epidídimo en la región distal, incrementa la movilidad espermática, además de que el fluido de la región distal es más eficaz para influir en la movilidad espermática que los fluidos de la región media y proximal, en esta especie el patrón de movilidad de los espermatozoides varía de zig-zag y en círculo en la región proximal a

ondulado en la región distal del epidídimo; sin embargo, la velocidad media de los espermatozoides no mostró ninguna variación regional (Nirmal y Rai, 1997). Estos autores concluyen que, la adquisición del potencial móvil está relacionado con el proceso de maduración espermática en los reptiles, pero debido a que se basaron únicamente en el incremento de la movilidad espermática, (Wong *et al.*, 1981; Depeiges y Dacheux, 1985; Breitbat, 1995; Nirmal y Rai, 1997; Aranha *et al.*, 2008), la investigación realizada no es suficiente para generalizar que este proceso ocurra en este grupo, tal como sucede en mamíferos, ya que a pesar de que la movilidad es una consecuencia directa, no es la única en el proceso de maduración. A pesar de ser escasas las investigaciones en reptiles, los trabajos previamente mencionados sugieren que tanto en reptiles como en mamíferos, el epidídimo desempeña un papel importante en la maduración de los espermatozoides.

2.3 La lagartija *Sceloporus siniferus* como modelo para determinar maduración espermática epididimaria en reptiles lacertílicos

Sceloporus siniferus es una lagartija ovípara, perteneciente al orden Squamata, familia Phrynosomatidae y se le conoce como lagartija espinosa (Maldonado, 2011). Es una especie de talla pequeña, y de cuerpo esbelto, con una longitud hocico-cloaca máxima de 72 mm, de 31-46 escamas dorsales pequeñas y quilladas, y 3-14 poros femorales por serie. Sus escamas ventrales son puntiagudas y sin muesca. Se caracterizan principalmente por ser de color dorsal pardo, con un par de líneas dorsolaterales claras de la parte superior del tímpano hasta la base de la cola. Su cabeza es de coloración parda salpicada con puntos oscuros y los lados del rostro tienen tonos anaranjados; los costados tienen manchas amarillentas dispuestas en forma diagonal y una mancha parda oscura bordeada de amarillo sobre el hombro. El vientre es blanquecino, y la región gular con motas oscuras dispuestas en forma diagonal, en los machos durante la reproducción, las motas son de color anaranjado (Fig. 2) (Köhler y Heimes 2002). Es nativa del sur de México y Guatemala, desde el nivel del mar hasta los 2438 msnm (Smith y Taylor 1950), se extiende a lo largo de la costa del Pacífico, desde el noroeste de Guerrero, Morelos hasta el este de Chiapas, penetra por la cuenca

del Balsas a Morelos, y en Oaxaca llega a los Valles Centrales (Köhler y Heimes 2002; Canseco y García, 2013). Habitan en pastizales, selva baja caducifolia, bosque de encino, bosques tropicales secos y de roble (Köhler y Heimes 2002; Canseco y García, 2013; Ramírez-Bautista *et al.*, 2015). El dimorfismo sexual en la especie no está totalmente definido, sin embargo, se sabe que el tamaño del cuerpo y la anchura de la cabeza son más grandes en machos, que en hembras (Lemos-Espinal *et al.*, 2001). De acuerdo con las observaciones de Davis y Dixon (1961) parece que el cortejo ocurre en mayo, ya que en junio y julio registraron hembras gestantes.



Figura 2. Foto de lagartija macho *Sceloporus siniferus*

Al igual que otras especies del género *Sceloporus*, su reproducción es estacional, y las hembras pueden tener hasta dos puestas por temporada, con 2 a 9 huevos por camada (Flores-Villela y Muñoz, 1993). Se ha observado que de octubre a febrero se encuentran ejemplares de todas las tallas (Köhler y Heimes 2002). Se ha reportado que el ciclo reproductivo de *S. siniferus* ocurre de marzo a octubre,

variando entre los meses durante el período reproductivo (Ramírez-Bautista *et al.*, 2015). La masa testicular aumenta en marzo y abril, presentando el máximo de mayo a agosto, y una disminución durante septiembre y octubre (Ramírez-Bautista *et al.*, 2015).

Esta especie se empleó pensando en la viabilidad del trabajo, ya que, de todas las especies de reptiles, las lagartijas son las que más fácilmente se pueden manipular, además de ser una familia de amplia distribución y que de acuerdo con la NOM-059-2010, se encuentra fuera de una categoría amenazada, sujetas a protección especial o en peligro de extinción.

3 JUSTIFICACIÓN

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en riqueza de reptiles (864 especies, lo que representa el 8.7% de los reptiles del mundo) (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014), los cuales están siendo amenazados, principalmente, por el tráfico de especies, la destrucción de su hábitat y actualmente por el cambio climático. Muchas técnicas y trabajos de reproducción animal asistida, aplicadas para machos, parten del conocimiento de la maduración de los espermatozoides, sin embargo, es un tema poco descrito para el grupo de reptiles, por lo que el estudio de este proceso en este grupo, es un tema que debe ser tratado con mayor interés por los investigadores.

En México, se han realizado varios estudios sobre la biología reproductiva de algunas especies de lacertilios, la mayoría de estos enfocados en establecer el patrón reproductivo de la especie, temporada de apareamientos, número de crías, entre otras variables, pero sin profundizar en aspectos como la fisiología espermática. La maduración de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, se ha estudiado ampliamente en muchas especies de mamíferos, y algunos trabajos en lacertilios indican que en algunas especies se presenta un proceso similar a la maduración espermática de mamíferos. Hasta el momento, no se ha podido determinar claramente si se lleva a cabo un proceso de maduración de los espermatozoides en el epidídimo de lacertilios, por lo que es importante

determinar, mediante pruebas bioquímicas más específicas, como la evaluación de la fosforilación de residuos de tirosina y la redistribución de carbohidratos en la membrana del espermatozoide, la existencia de un proceso de maduración en el epidídimo, y así aportar conocimiento para un grupo tan importante como los reptiles que antecede evolutivamente a los mamíferos, permitiendo el supuesto de que es en ellos en donde se originó el proceso de maduración espermática epididimaria.

Finalmente, con los resultados obtenidos del presente estudio, se aportará información que permita entender mejor la funcionalidad del epidídimo en lacertilios y determinar si en este órgano los espermatozoides pasan por el proceso de maduración espermática epididimaria. De igual forma, es imperativo aplicar los conocimientos fisiológicos y bioquímicos en técnicas de reproducción asistida, generando protocolos de conservación de germoplasma, criopreservación y fertilización in vitro en reptiles, para evitar su extinción.

4 OBJETIVO GENERAL

Determinar en los espermatozoides de la lagartija *Sceloporus siniferus* que recorren el ducto epididimario, los cambios bioquímicos indicativos de un proceso de maduración.

5 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener espermatozoides del testículo y de cada una de las tres regiones anatómicas del epidídimo de *S. siniferus* y durante los meses de reproducción (mayo a julio):
- Analizar los cambios en la distribución de carbohidratos de la membrana del espermatozoide.
- Determinar los cambios en la proporción de la fosforilación de residuos de tirosina, en los espermatozoides.

6 HIPÓTESIS

- Si se presentan modificaciones bioquímicas en los espermatozoides de la lagartija *Sceloporus siniferus* durante su tránsito por el epidídimo, en comparación con los espermatozoides testiculares, entonces ocurre el proceso de maduración espermática epididimaria.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Reactivos

El NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂ 2H₂O y el formaldehído fueron obtenidos de los laboratorios Baker. El Tritón X-100, las lectinas WGA-FITC, Con-A-FITC, UEA-FITC, los azúcares específicos, N-Acetil-D-Glucosamina, L-Fucosa, D-Manosa y el anticuerpo monoclonal p-Tyr (PY20) de los laboratorios Sigma. El anticuerpo IgG2b de los laboratorios Santa Cruz Biotechnology. El anestésico clorhidrato de Xilacina (Xilapet 2%) del laboratorio Pet's Pharma de México, S.A. de C.V.).

7.2 Soluciones

La solución fisiológica para realizar el picado de tejido fue Ringer, ajustado a pH 7.2, consistente de NaCl 95mM, KCl 5mM, KH₂PO₄ 1.1mM y CaCl₂ 2H₂O 1.7mM.

Para las diluciones se empleó un amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.4, consistente de NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM.

7.3 Captura y selección de ejemplares de *Sceloporus siniferus*.

Los machos adultos de la lagartija *S. siniferus* fueron obtenidos mediante un régimen de captura mensual en la localidad conocida como "La Lobera", Municipio de Santa Inés del Monte, Zachila en Oaxaca; localidad ubicada entre las coordenadas 16°55'20"; 96°49'23" de latitud Norte y 16°55'55"; 96°48'22" de longitud Oeste, a una altitud 1700 msnm. El período de muestreo comprendió un ciclo anual completo, que abarcó de abril de 2015 a junio de 2016. En cada visita se seleccionaron tres machos adultos en etapa reproductiva. Las lagartijas fueron

capturadas a mano, preferentemente por la mañana mientras se encontraban con menor actividad.

7.4 Criterios de inclusión de los organismos de estudio.

Para la selección de los ejemplares de estudio, se tomaron en cuenta las características descritas por Lemos-Espina *et al.* (2001):

- (a) Longitud hocico-cloaca, mayor de 40 mm;
- (b) Abultamiento visible en la región ventral de la base de la cola debido a la presencia de hemipenes retraídos al interior de la cloaca; y
- (c) Escamas poscloacales de tamaño mayor comparadas con las de las hembras.

Los especímenes seleccionados fueron depositados individualmente en sacos de manta, que se colocaron en una caja con ventilación natural, protegiéndolos de cambios bruscos de temperatura para su transporte al laboratorio en las instalaciones de la UAMI. A partir de su captura y hasta el arribo al laboratorio, los especímenes se revisaron periódicamente para alimentarlos con tenebrios y grillos e hidratarlos. Para la captura y utilización de los animales de estudio se cuenta con el permiso de colecta (FAUT 0070).

7.5 Obtención y procesamiento de espermatozoides.

Una vez en el laboratorio, los ejemplares permanecieron por un máximo de 24 horas en un terrario de cristal con agua y alimento vivo. A los ejemplares se les practicó la eutanasia mediante inyección intraperitoneal en una de las extremidades posteriores con 0.20 mL de Xilapet 2%. El manejo de los ejemplares se encontró en estricto apego a los estándares internacionales indicados en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Clark *et al.*, 1996).

Inmediatamente después de la muerte de los ejemplares fueron tomadas sus medidas anatómicas: Longitud hocico-cloaca, longitud de la cola, ancho y largo de la cabeza. Posteriormente, los animales se colocaron en posición supina y vistos al microscopio estereoscópico, se extrajeron ambos testículos y epidídimos. De los testículos se midió el largo y el ancho; del epidídimo solo la longitud total, con un calibrador digital (precisión = $\pm 0.5\text{mm}$); y el peso fresco en una balanza analítica METTLER TOLEDO AB204-S (precisión = $\pm 0.1\text{mg}$). Para obtener las

regiones anatómicas del epidídimo, cada órgano se seccionó en tres segmentos transversales de proporciones semejantes: (a) caput (= segmento proximal al testículo), (b) corpus (= segmento medio) y (c) cauda (= segmento distal) (Fig. 3), similar a las divisiones reportadas en *L. vivípara* (Depeiges y Dacheux, 1985). Para reducir al mínimo las posibles alteraciones postmortem, los órganos se mantuvieron al interior de una cámara húmeda con 0.09% de NaCl y ésta a su vez, se colocó en hielo.

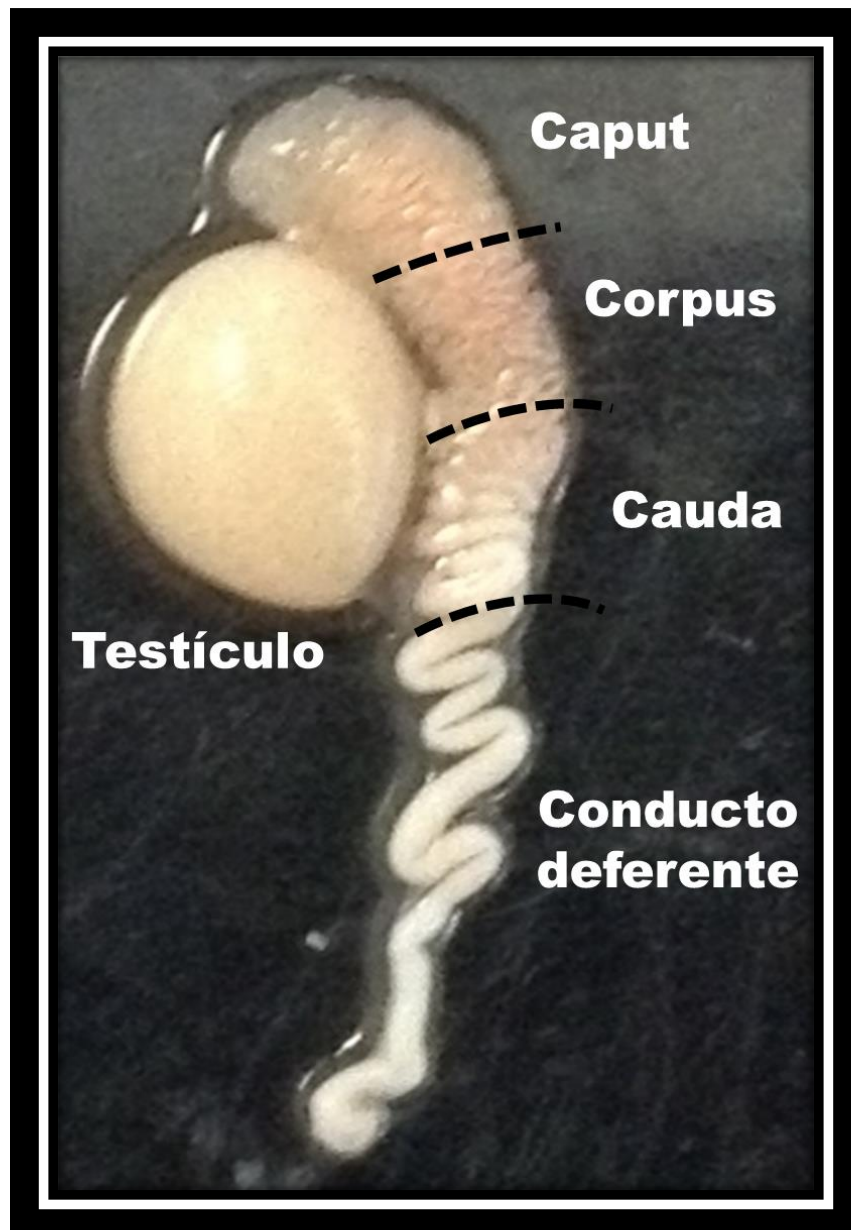


Figura 3. Testículo, regiones anatómicas del epidídimo (Caput, Corpus y Cauda) y conducto deferente de la lagartija *Sceloporus siniferus*.

Una vez registradas sus medidas, cada testículo y región del epidídimo se colocó en una caja Petri diferente, y se le agregó 1 ml de solución fisiológica Ringer. Se realizó un picado del tejido de acuerdo a lo descrito por Cervantes *et al.*, (2008), el material biológico se filtró a través de una malla de Lycra® con diámetro de trama de 20µm directamente en un tubo Eppendorf de 1.5ml para eliminar los fragmentos grandes de tejido (León-Galván *et al.*, 1999; Cervantes *et al.*, 2008). Finalmente, el material filtrado se lavó y se centrifugó a 500 g x 5 min, el sobrenadante se retiró y el botón celular se disgregó suavemente con 1 mL de solución Ringer dos veces; a la suspensión resultante se le denominó: “los espermatozoides testiculares/epididimarios lavados”.

7.6 Evaluación de espermatozoides

Los parámetros espermáticos básicos se determinaron de las muestras de los espermatozoides lavados siguiendo las especificaciones técnicas descritas en el manual de la Organización Mundial de la Salud para la evaluación del semen humano (WHO, 2010), pero realizando los ajustes necesarios para espermatozoides de lagartija obtenidos del testículo y del epidídimo, ya que los espermatozoides se obtuvieron del tejido del epidídimo en un volumen fijo de 1 mL, por lo que la concentración espermática obtenida se consideró como millones de espermatozoides / órgano

Las variables consideradas y el método para su obtención se describen a continuación:

-Total de espermatozoides por órgano (No. Células X 10^6 / órgano); valor que se obtuvo al realizar el conteo de los espermatozoides utilizando una cámara de Neubauer. Para lo cual se realizó una dilución de la muestra dependiendo de la densidad de espermatozoides observada en el campo de 400x, como se detalla en el manual de la OMS, posteriormente se llenaron ambas cámaras de la cámara Neubauer con 10-15 µL de la dilución realizada y se obtuvo la concentración espermática por medio de la fórmula: $N/n \times (1/20) \times \text{factor de dilución}$, donde N: es el número total de espermatozoides contados de ambas cámaras y n: los renglones contados.

-Viabilidad, de la suspensión de espermatozoides; se colocó una alícuota de 5 μL en un portaobjetos, y se mezcló con 5 μL de solución de Eosina-Nigrosina, (0.67 g Eosina Y y 10 g Nigrosina), como tinción supravital, para elaborar un frotis como se muestra en el esquema (Fig. 4), se dejó secar por 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente realizar el conteo observando al campo claro del microscopio de luz transmitida 100 células en 1000x

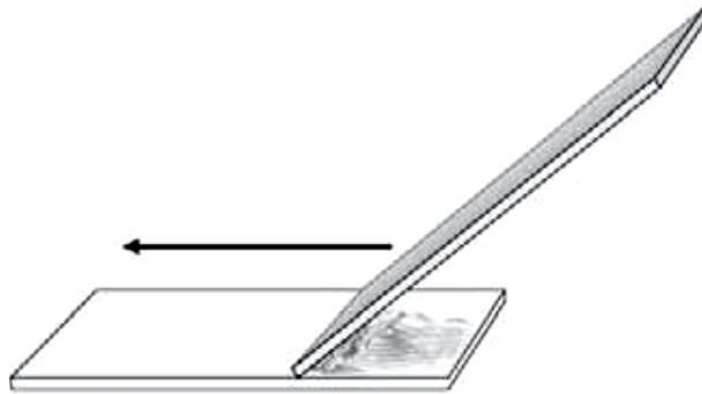


Figura 4. Muestra de espermatozoides con Eosina-Nigrosina, en el borde posterior del portaobjetos, extendiéndose hacia delante en un ángulo de 45° (OMS, 2010)

-Movilidad, una alícuota de 10 μL de suspensión de espermatozoides lavados se colocó sobre un portaobjetos precalentado a 34°C , la suspensión se cubrió con un cubreobjetos y se realizó el conteo de 100 espermatozoides en el microscopio de luz transmitida a 400X, distinguiendo los móviles e inmóviles. En los móviles se distinguió los espermatozoides con movilidad progresiva y no progresiva.

-Morfología espermática, la morfología de los espermatozoides se revisó con la finalidad de: (1) discriminar primeramente las células espermátogénicas, entre las espermátidas en etapas finales de su diferenciación, y los espermatozoides, las primeras no se consideraron para el estudio de los aspectos bioquímicos y (2), en general, para determinar la probable existencia de características indicativas de inmadurez como la presencia de gota citoplasmática, así como distinguir alteraciones, como la separación entre cabeza y flagelo, hinchamiento celular o enroscamientos del flagelo, debido al proceso de obtención y lavado de espermatozoides. Se tomó una alícuota de 10 μL de espermatozoides en solución

Ringer más 10 μ L de fijador (formaldehído 1%). La alícuota se observó en microscopio de contraste de fases y se contaron 100 espermatozoides a 1000x, se registraron las anomalías.

Con la finalidad de demostrar si los espermatozoides, después de que abandonan el testículo, sufren cambios bioquímicos relacionados con el proceso de maduración espermática epididimaria, se determinó el patrón y distribución de carbohidratos, y la proporción de células que presentaban fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas.

7.7 Detección y patrón de distribución de carbohidratos de la membrana plasmática.

Para el marcaje de los carbohidratos de interés, se utilizaron las siguientes lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC): Aglutinina de *Triticum vulgare* (WGA), que se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico; Aglutinina de *Canavalia ensiformis* (ConA), que se une a residuos de manosa y Aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA), que se une a residuos de fucosa.

De cada muestra de espermatozoides lavados, correspondientes a cada uno de los diferentes órganos sexuales de estudio, y en el caso del epidídimo, las diferentes regiones, se obtuvieron tres alícuotas diferentes y cada una se mezcló con un volumen de 5 μ l de una solución de las diferentes lectinas diluidas 1:50 en PBS, y se incubaron durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las observaciones se realizaron al microscopio de epifluorescencia para registrar el patrón de distribución de cada carbohidrato marcado en la membrana de los espermatozoides.

De manera complementaria a las observaciones al microscopio, los espermatozoides marcados con lectinas fueron analizados por citometría de flujo para registrar la intensidad de la fluorescencia como indicador de la cantidad de carbohidratos de cada tipo en los espermatozoides obtenidos de cada región (Jiménez *et al.*, 2003). Alícuotas de 40 μ L de espermatozoides en 500 μ L de PBS fueron analizadas mediante citometría de flujo (FACScan), evaluándose 10,000

células por muestra, analizando los histogramas de intensidad de fluorescencia (IF) contra el número de células marcadas.

Se realizó un control negativo para cada muestra, incubando cada lectina por 30 minutos con su respectivo azúcar específico a una concentración de 0.3 M antes de ser puestas en contacto con los espermatozoides (Fierro *et al.*, 1996).

7.8 Detección y patrón de distribución de fosforilación de residuos de tirosina

Los espermatozoides del testículo y de las diferentes regiones del epidídimo, se fijaron con formaldehído al 1% en amortiguador de fosfatos por 30 min a 4°C. Se permeabilizaron con tritón X-100 0.1% en amortiguador de fosfatos, durante 10 min a temperatura ambiente. La fosforilación de residuos de tirosinas se evaluó utilizando un anticuerpo monoclonal antifosfotirosina conjugada con FITC (clone PY20-FITC, Sigma Chemical Co.), concentración final de 10µg/mL durante 1hr a temperatura ambiente. Como control negativo se utilizó un anticuerpo no específico IgG2b (Santa Cruz Biotechnology), para uniones no específicas concentración final de 10µg/mL.

Las muestras marcadas se analizaron por dos metodologías: microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. La microscopía permite determinar los distintos patrones que se pudieran presentar en los espermatozoides de testículo y epididimarios y la citometría de flujo permite analizar la cantidad de células con fluorescencia. En el análisis por citometría de flujo, se tomaron alícuotas de 40 µL de espermatozoides evaluando 10,000 células por muestra.

7.9 Análisis estadístico de resultados

Para verificar la existencia de diferencias significativas, se realizó un análisis paramétrico de la normalidad y homocedasticidad de la muestra (análisis de varianza "ANOVA"), considerando $p < 0.05$ (Sokal y Rohlf, 1995), posteriormente se procedió a realizar una prueba *post hoc* (Tukey) con la que se podría determinar la posible existencia de diferencias entre las medias.

Sin embargo, cuando la distribución de los valores no cumplió con las características de normalidad y homocedasticidad se utilizó un análisis no

paramétrico (Kruskal-Wallis), seguido de la prueba *post hoc* Z-Kruskal-Wallis para determinar qué grupos diferían de otros.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Características morfológicas y sexuales de los ejemplares

Sceloporus siniferus de estudio

A lo largo del ciclo anual se observó que los machos adultos de *Sceloporus siniferus* desarrollaron manchas anaranjadas en la región gular, sólo durante la época reproductiva, lo cual no se había descrito para la especie (Fig. 5).

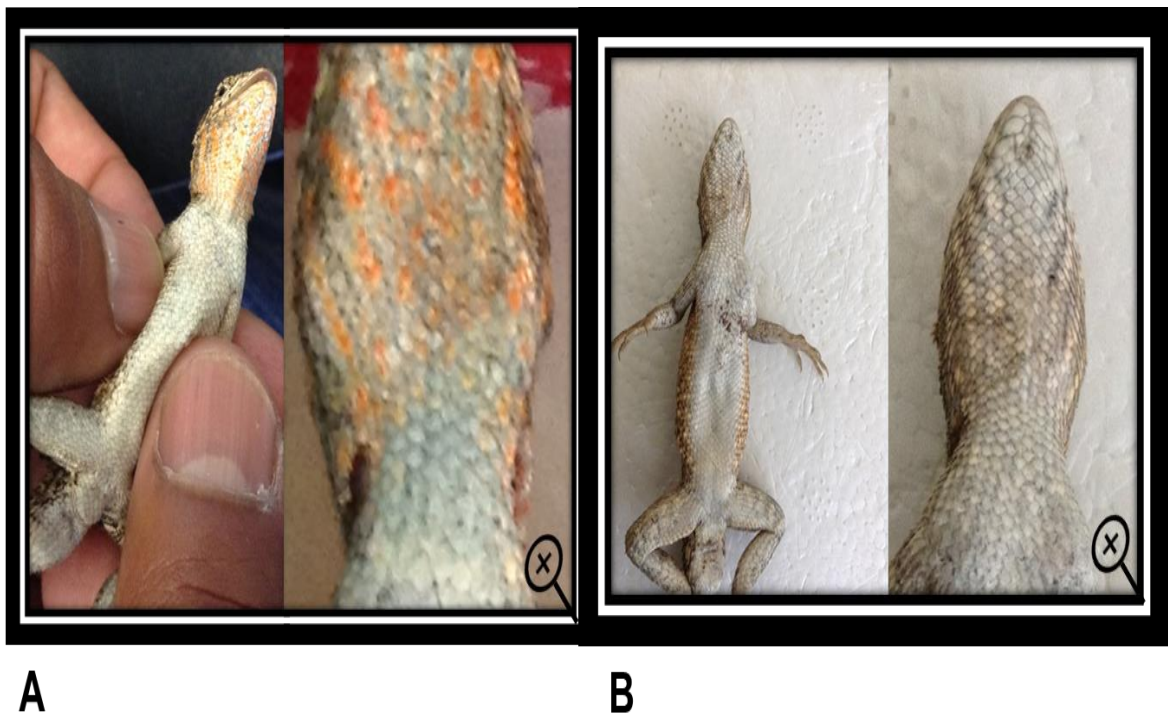


Figura 5. Composición fotográfica de *S. siniferus*, de ejemplares obtenidos durante dos etapas diferentes del ciclo reproductivo, en la que se muestra **A:** Cambio en la coloración de las escamas de la región gular, indicativo de actividad sexual durante la época reproductiva (mayo-julio) de *Sceloporus siniferus*. **B:** Lagartija adulta durante la época no reproductiva (septiembre-marzo)

En otras especies de lagartijas, estos cambios en la coloración de las escamas se presentan como indicativo de actividad relacionada con el cortejo (Pianka y Vitt, 2006). Por ejemplo, los machos adultos de *Sceloporus undulatus* poseen manchas ventrales azules y negras que funcionan para el reconocimiento del sexo y la señalización social intrasexual (Cox *et al.*, 2005), lo que podría estar sucediendo en la especie *Sceloporus siniferus*, ya que, este cambio únicamente se observó durante los meses de cópula (mayo a julio).

Lo anterior coincide con la generalidad de lagartijas del género *Sceloporus*, ya que son notables por su dimorfismo sexual, siendo los machos más grandes que las hembras (Fitch, 1978) y, en la época de reproducción, desarrollando patrones de color en la región gular, vientre y dorso, que regularmente se asocian con la madurez sexual y el estatus social (Carpenter, 1995; Lemos-Espinal *et al.*, 1996). Estos cambios se producen por el efecto de las hormonas que circulan en el torrente sanguíneo, principalmente la testosterona (Cox *et al.* 2005).

En *Sceloporus siniferus* este cambio de coloración durante la época de reproducción, podría estar relacionado con el aumento en la concentración de testosterona que provoca el inicio de la espermatogénesis. La testosterona es esencial para la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis (Weinbauer y Nieschlag, 1993; Steinberger, 1971; O'Donnell, 2006), sin embargo, se reconoce que la participación conjunta de las gonadotropinas y los andrógenos también intervienen en su inicio y mantenimiento en las especies estacionales estudiadas, ambos tipos de hormonas estimulan el reinicio de la espermatogénesis después de su regresión natural o inducida experimentalmente (O'Donnell *et al.*, 2006; Arenas-Ríos *et al.*, 2012)

El cambio en la coloración de algunas regiones del cuerpo, también funciona para obtener alimentos de buena calidad (Cooper y Greenberg, 1992), enviar señales hacia machos rivales, desafiar a depredadores y atraer a las hembras (Whiting *et al.*, 2003). Asimismo, se ha observado que los machos con un sistema elaborado de señales de color, tienen acceso a territorios de mejor calidad y pueden aparearse más fácilmente (Anderson, 1994). Nuestros resultados parecen indicar que *S. siniferus* también desarrolla estos cambios de color durante la época de

reproducción, con la finalidad de que los machos puedan cortejar y tener mejor oportunidad de copular con las hembras.

De los 33 machos capturados a lo largo de la investigación, solo fueron incluidos 13 que fueron capturados durante mayo, junio y julio (2015 y 2016), estos últimos con una longitud hocico cloaca (LHC) promedio de 56.4 ± 3.5 mm. La longitud de los testículos y epidídimos mostraron variación entre los meses, siendo pequeños durante los meses de enero y febrero, e iniciando el recrudescimiento testicular en marzo y abril, alcanzando su tamaño máximo desde mayo hasta julio, seguido por una disminución a partir de septiembre (Fig. 6).

Tras la disección de los organismos, se establecieron las fechas en que *S. siniferus* produce espermatozoides, no sólo a nivel testicular, sino en los conductos epididimarios, se seleccionaron los ejemplares que cumplieron con las características morfológicas y reproductivas necesarias.

Los machos capturados de mayo a julio, tenían los testículos agrandados y los epidídimos se observaban claramente blancos, por la gran acumulación de espermatozoides (Fig. 7), los machos con esas características fueron clasificados como reproductivamente maduros, mientras que los individuos capturados durante el resto de los meses del año, fueron considerados inactivos sexualmente, debido a la involución testicular y la ausencia de espermatozoides a nivel epididimario

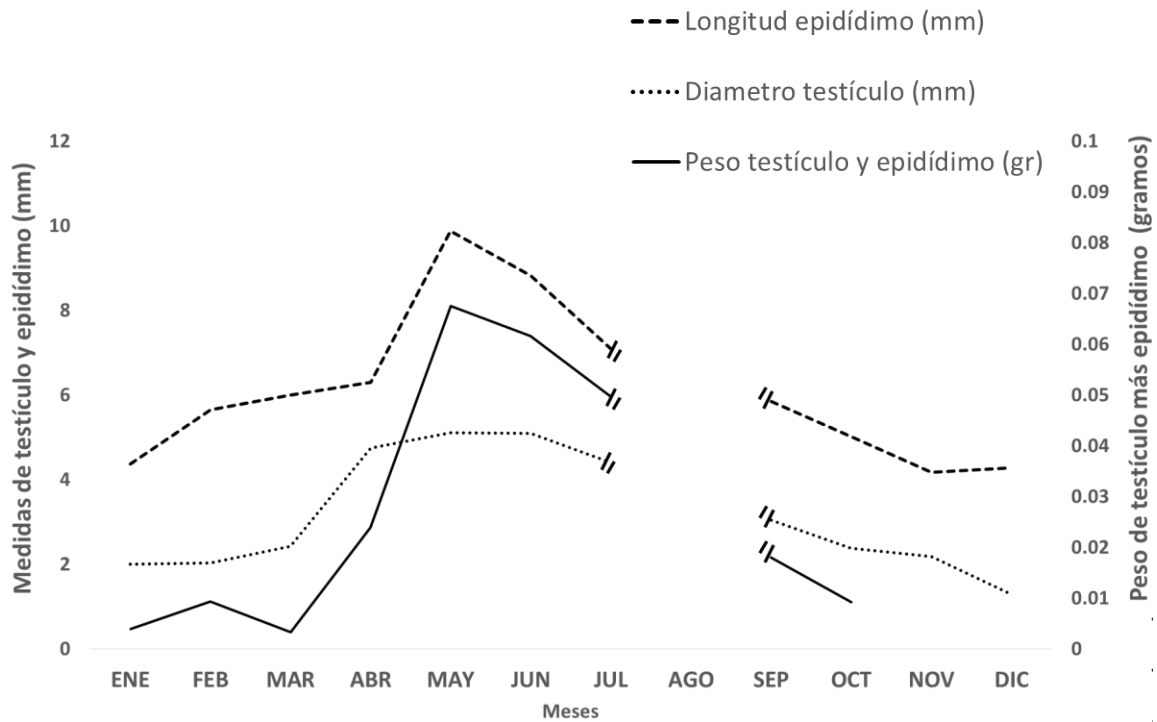


Figura 6. Longitud de epidídimo (mm), diámetro de testículo (mm) y peso de testículos unidos a epidídimo (g), de *Sceloporus siniferus* adultos, capturados durante el ciclo anual (línea discontinua indica la falta de datos durante agosto). $n= 3$ individuos por mes.

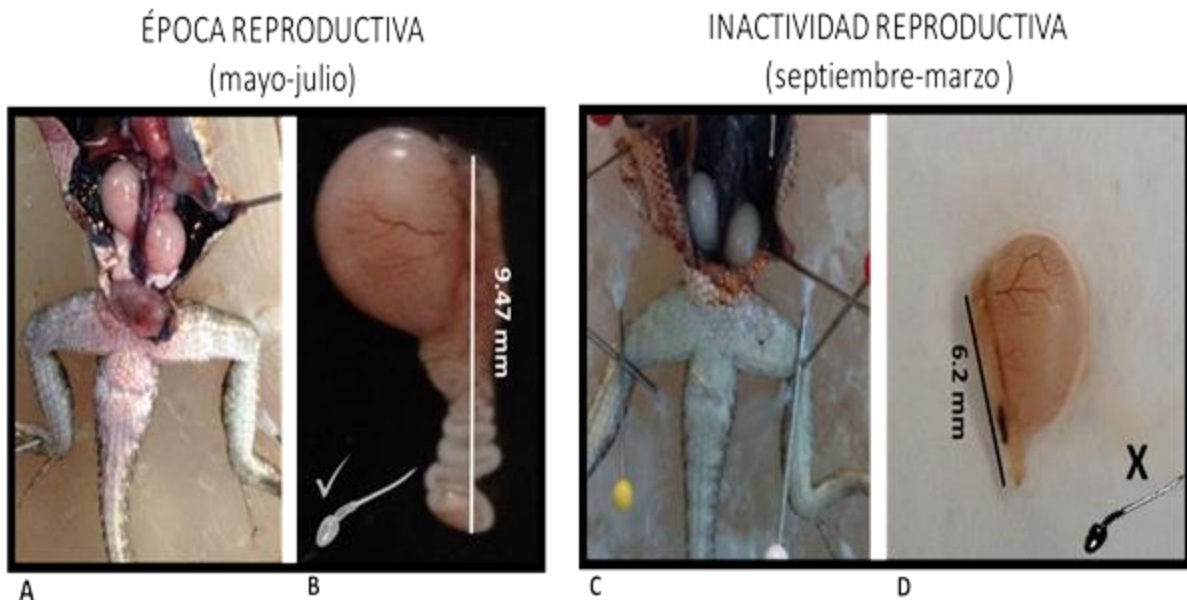


Figura 7. Fotografías en las que se muestran las características somáticas de los órganos sexuales del macho adulto de *S. siniferus*. **A:** lagartija disecada durante la época reproductiva (mayo-julio), **B:** testículo y epidídimo agrandados debido a la presencia de espermatozoides, **C:** lagartija disecada durante la inactividad reproductiva (septiembre-abril). **D:** disminución del tamaño testicular y del epidídimo debido a la ausencia de espermatozoides.

Recientemente Ramírez-Bautista *et al.*, (2015), han reportado que *S. siniferus* tiene un ciclo reproductivo estacional, que va de marzo a octubre y que los machos llegan a la madurez sexual cuando alcanzan los 40 mm de LHC (Ramírez-Bautista *et al.*, 2015). Sin embargo en el presente estudio, determinamos la involución del testículo y del epidídimo a partir de septiembre, así como la ausencia total de espermatozoides en ambos órganos a partir de octubre. Otra manera para determinar si los machos han alcanzado la madurez sexual, es cuando presentan los testículos y epidídimos agrandados, lo que normalmente se asocia con la producción y almacenamiento de espermatozoides (Lozano, 2013), esto se corroboró con las observaciones realizadas durante la disección, y se determinó que los machos capturados e incluidos en esta investigación, cumplieron el criterio de estado adulto y de madurez sexual.

Los resultados obtenidos en este estudio, coinciden con lo reportado por Ramírez-Bautista *et al.*, (2015), quienes registran que la masa testicular de esta especie, comienza a aumentar de marzo a abril, con su pico máximo entre mayo y agosto, y la regresión comienza en septiembre y octubre. Estos autores encontraron una correlación positiva entre el aumento de la masa testicular con la precipitación y el fotoperiodo en *S. siniferus*, lo que indica que las horas del día y la precipitación, son factores importantes en su actividad reproductiva (Ramírez-Bautista *et al.*, 2015). Se ha reportado que, en muchas especies de lagartos, la disponibilidad de alimentos, la precipitación, el fotoperiodo y la temperatura pueden afectar la tasa de crecimiento, el tamaño de puesta, así como la edad y la talla de madurez sexual (Benabib, 1994; Wang *et al.* 2011; Horváthová *et al.* 2013; Ramírez-Bautista *et al.*, 2015). Estudios en ecología reproductiva, han demostrado que el ambiente es el factor principal del que dependen los reptiles, incluso las diferencias en la época reproductiva entre las especies o entre las poblaciones de la misma especie dependen en gran medida de las condiciones ambientales (Galán, 1997), principalmente la variación estacional de los factores ambientales juega un papel fundamental en la cronología de los sucesos reproductivos como la gametogénesis (Méndez de la Cruz *et al.*, 2014).

8.2 Análisis de los espermatozoides testiculares y epididimarios de *S. siniferus*

8.3 Concentración espermática

El análisis de espermatozoides se realizó en las muestras de mayo a julio, a partir de que se encontraron espermatozoides en testículo y en epidídimo. Para diferenciar los espermatozoides del resto de las células germinales obtenidas de testículo, principalmente espermátidas alargadas, se tomó como parámetro de discriminación los residuos de citoplasma, los cuales estaban presentes en las espermátidas y ausentes en los espermatozoides (Fig 8).

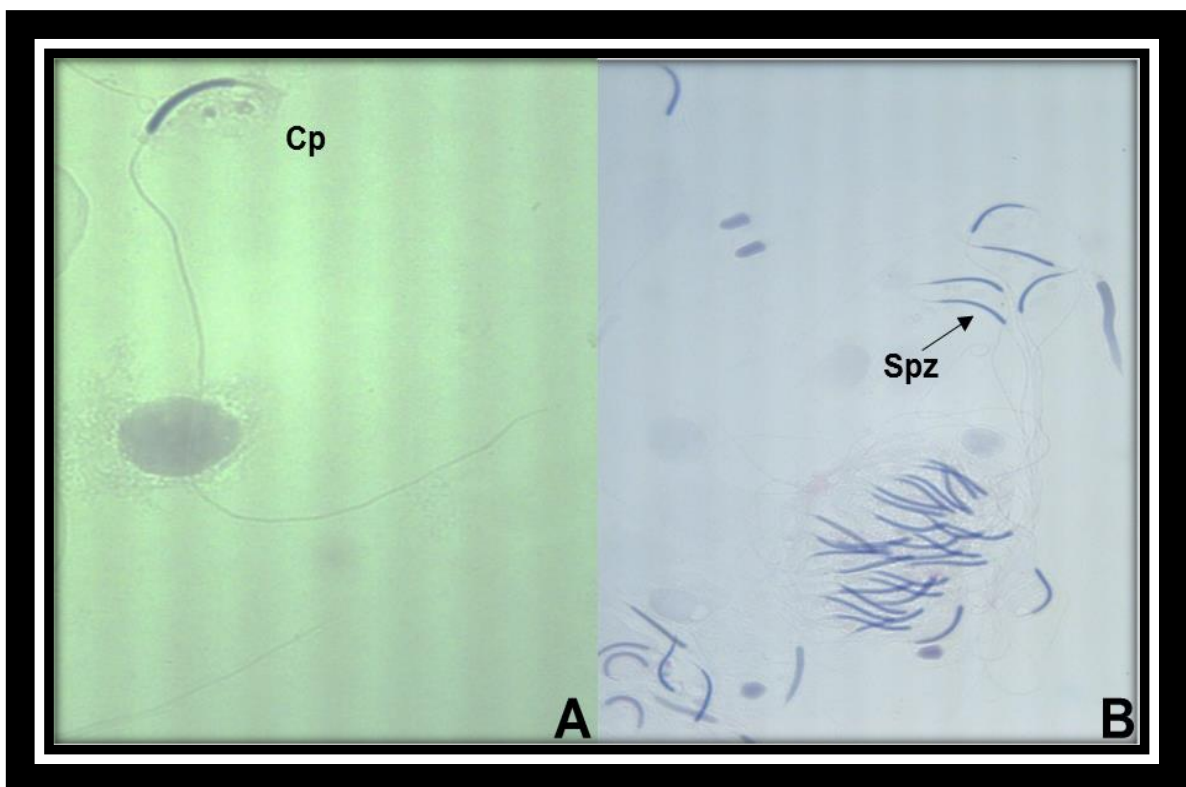


Figura 8. Fotografías en las que se muestra células germinales obtenidas de testículo, observadas por microscopía de campo claro. **A:** espermátida reconocida por restos de citoplasma (Cp) 100X; **B:** espermatozoides (Spz) formados completamente sin restos de citoplasma 40X.

El análisis de la presencia de espermatozoides de la lagartija *S. siniferus* mostró que en abril no hubo espermatozoides en el epidídimo (Tabla 1), aunque en el testículo se encontró una concentración espermática alta debido, muy probablemente, a que el proceso de espermiación no había ocurrido. En las muestras obtenidas de mayo a julio se encontraron espermatozoides en el testículo y epidídimo, con una concentración mayor durante el primer mes, valor que disminuyó en los siguientes meses, muy probablemente debido a la temporada de cópulas, la concentración espermática continuó disminuyendo en septiembre hasta desaparecer en octubre, confirmando que en estos últimos meses los machos están terminando su actividad reproductiva. El mes de agosto no se reporta debido a que, no hubo muestras para analizar a causa de la ausencia de especímenes en campo.

CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES (MILLONES DE SPZ / ÓRGANO)											
[] Spz	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	SEP	OCT	NOV	DIC
Testículo	0±0	0±0	0±0	69.16±17.6	21.87±14.6	50.20±13.1	14.75±4.8	2.26±0.3	0±0	0±0	0±0
Caput	0±0	0±0	0±0	0±0	8.37±4.3	8.98±2.5	10.5±0	0.53±0.1	0±0	0±0	0±0
Corpus	0±0	0±0	0±0	0±0	7.5±2	2.36±2.0	2.56±1	0.76±0.3	0±0	0±0	0±0
Cauda	0±0	0±0	0±0	0±0	9±0.2	3.97±3.1	10.12±6.2	0.4±0.2	0±0	0±0	0±0

Tabla 1. Concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides/órgano) de testículo, caput, corpus y cauda del epidídimo de *S. siniferus* obtenidos mensualmente. Promedio ± EE. Kruskal Wallis seguido de Z-Kruskal-Wallis, $p < 0.05$ (n=33)

Ramírez-Bautista *et al.*, 2015, mencionan que durante septiembre y octubre los machos probablemente todavía tienen espermatozoides en el epidídimo. Sin

embargo, las afirmaciones de estos autores no tienen base en estudios histológicos, sino que se basan solo en lo reportado por otros autores que realizaron estudios histológicos en otras especies y encontraron que los machos presentan espermatozoides epididimarios durante la etapa inicial de la regresión (regresión temprana) (McKinney y Marion 1985; Hernández-Franyutti y Uribe, 2012). Los resultados de esta investigación muestran que esto no podría estar sucediendo para esta especie ya que solo hasta septiembre se pueden encontrar espermatozoides dentro del túbulo epididimario, encontrando concentraciones de espermatozoides muy bajas con respecto a los meses de mayo a julio (Tabla 1).

8.4 Movilidad espermática

La movilidad de los espermatozoides extraídos del testículo y del epidídimo, tanto la progresiva como la total, mostraron un incremento, a partir del momento en que los espermatozoides ingresan al corpus del epidídimo (Fig. 9).

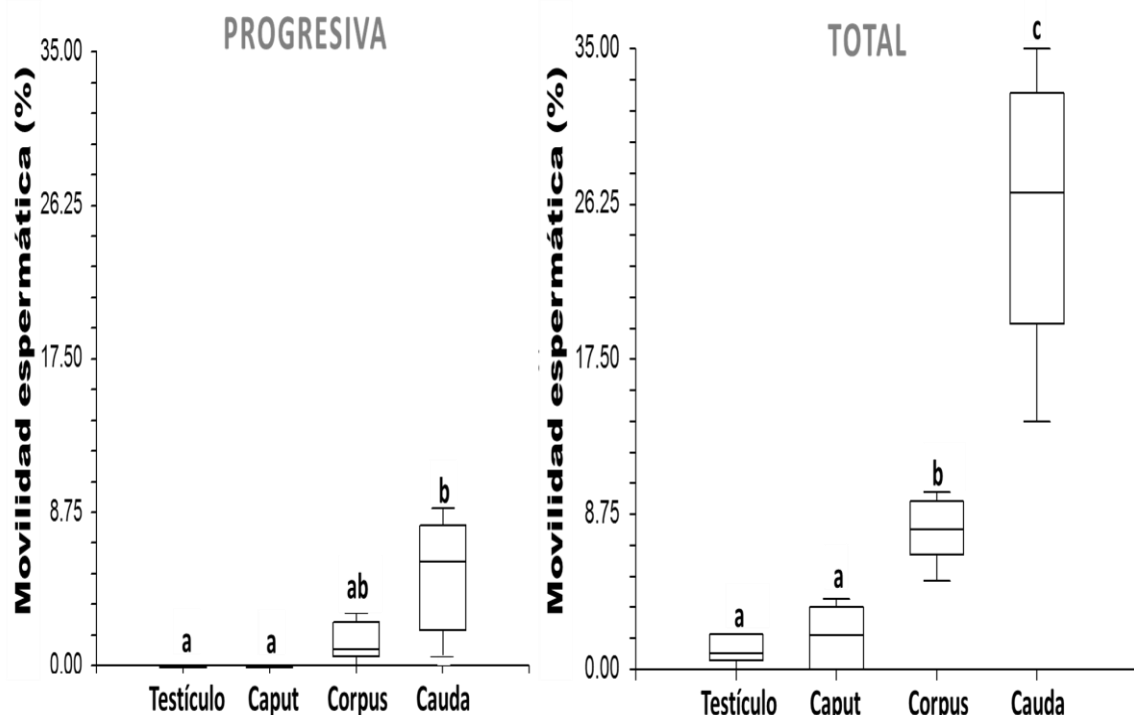


Figura 9. Movilidad progresiva y total de espermatozoides extraídos de testículo, caput, corpus y cauda del epidídimo de *S. siniferus*. Las barras indican la distribución de los datos observados con respecto a la mediana. Letras indican diferencias significativas entre regiones. Kruskal Wallis, seguido de Z-Kruskal-Wallis *post hoc*, $p < 0.05$. $n=6$ lagartijas

Los estudios realizados en otras especies de lacertilios, como es el caso de la lagartija *L. vivipara* estudiada por Depeiges y Dacheux (1985), mencionan que la adición de cafeína, indujo movilidad progresiva en espermatozoides obtenidos de la región proximal, media y distal del epidídimo, mientras que en los espermatozoides testiculares no tuvo efecto. Por otra parte, en la lagartija *Mabuya carinata*, el aumento de la movilidad se relacionó con la concentraciones de cationes, encontrándose mayor movilidad cuando la concentración de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ aumentó de la región proximal a la región distal del epidídimo (Aranha *et al.*, 2008). Mientras que en el gecko *H. flaviviridis* al aumentar el volumen del fluido del epidídimo en su región distal, se incrementó la movilidad espermática, por lo que se concluyó que el volumen del fluido epididimario estuvo directamente relacionado con la movilidad de los espermatozoides (Nirmal y Rai, 1997). El aumento de movilidad observado en *S. siniferus*, a partir de la región del corpus coincide con lo observado para estas especies de saurios donde el incremento de movilidad ocurre mientras los espermatozoides pasan a través del epidídimo (Depeiges y Dacheux, 1985; Nirmal y Rai, 1997; Aranha *et al.*, 2008).

9.5 Viabilidad espermática

Las células obtenidas de los dos órganos y de las diferentes regiones del epidídimo, mostraron encontrarse en buena condición fisiológica (Fig. 10), no mostrando diferencias significativas ($H= 0.69$ $P = 0.87$, $n= 13$) entre estas (Fig. 11). Presentando una viabilidad superior al 60% en todas las regiones, lo que permitió realizar las pruebas bioquímicas.

La integridad es de vital importancia debido a que está relacionada con su metabolismo, capacitación, reacción acrosomal y la unión del espermatozoide con la superficie del ovocito (Simón-Salvador *et al.*, 2016). Por esta razón, es importante la determinación de la función de la membrana, ya que puede ser un indicador indirecto de la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Simón-Salvador *et al.*, 2016).

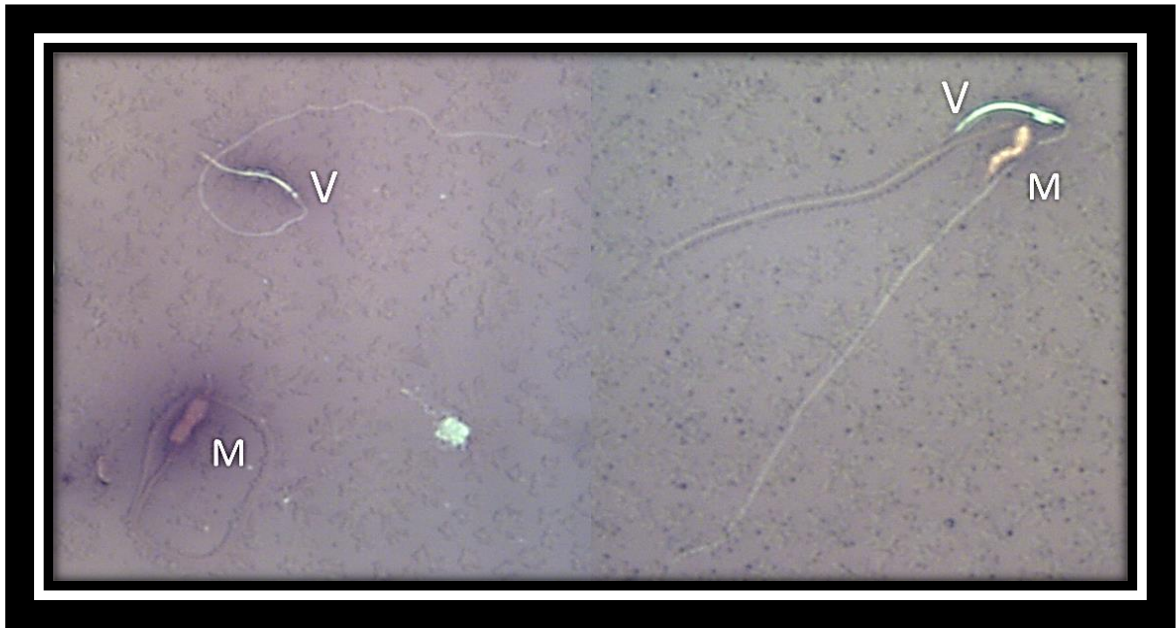


Figura 10. Fotografías obtenidas por microscopía de luz transmitida en la que se muestra espermatozoides obtenidos de epidídimo vivos (v) y muertos (M) de *S. siniferus*, tinción Eosina-Nigrosina, 1000X.

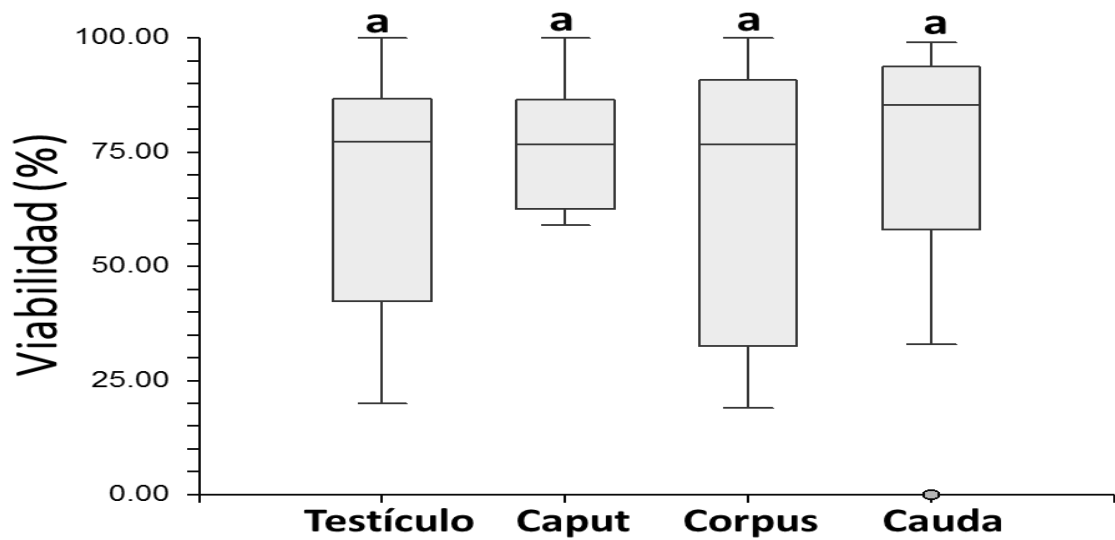


Figura 11. Porcentaje de viabilidad de los espermatozoides obtenidos de testículo y epidídimo (caput, corpus y cauda) de *S. siniferus*, durante los meses de actividad reproductiva. Las barras indican la distribución de los datos observados con respecto a la mediana. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre regiones. Kruskal Wallis, $H= 0.69$ $P = 0.87$, $n= 13$

8.5 Gota citoplasmática

La evaluación de la gota citoplasmática en los espermatozoides obtenidos de testículo, se realizó considerando únicamente los gametos que presentaban la forma de un espermatozoide completamente formado y sin exceso de residuos citoplasmáticos en su cabeza (Fig. 12A), los espermatozoides de testículo con gota citoplasmática fueron reconocidos porque esta estructura se presenta únicamente en el cuello del espermatozoide (Fig. 12B), y no en toda la cabeza.

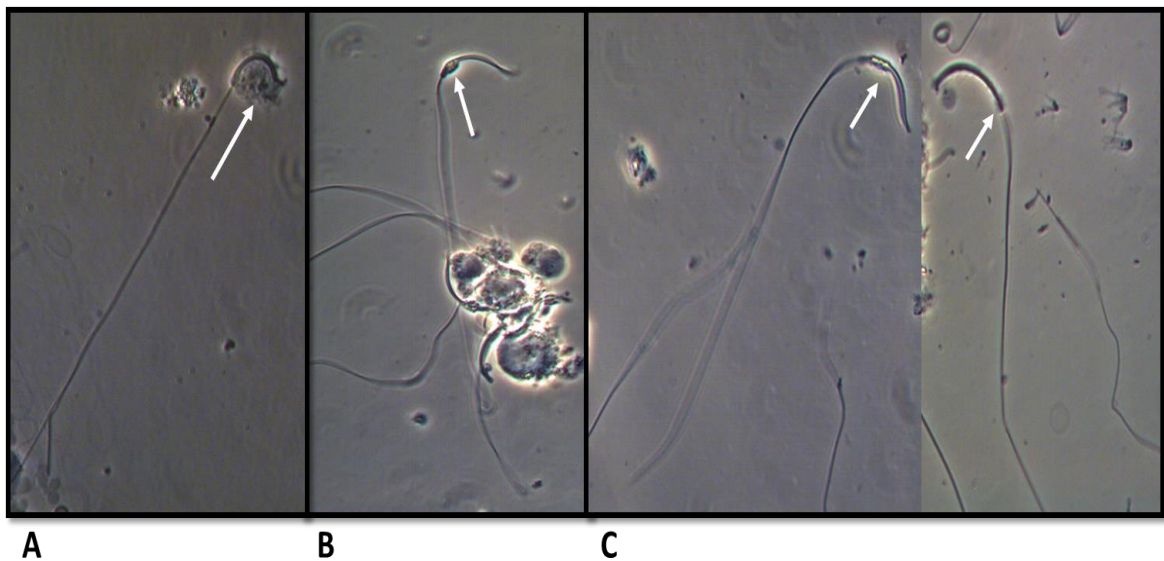


Figura 12. Fotografías obtenidas por microscopia de contraste de fases en las que se muestran células germinales de testículo. **A:** Célula germinal (espermátida) con residuos de citoplasma en cabeza. **B:** Espermatozoide testicular con gota citoplasmática en el cuello. **C:** Espermatozoides testiculares, sin gota citoplasmática. Contraste de fases. 1000X.

La gota citoplasmática de los espermatozoides obtenidos de las regiones del epidídimo (Fig. 13), fue reconocida con más facilidad ya que en este órgano las únicas células germinales presentes son los espermatozoides, a diferencia del testículo donde encontramos diferentes tipos de células germinales.

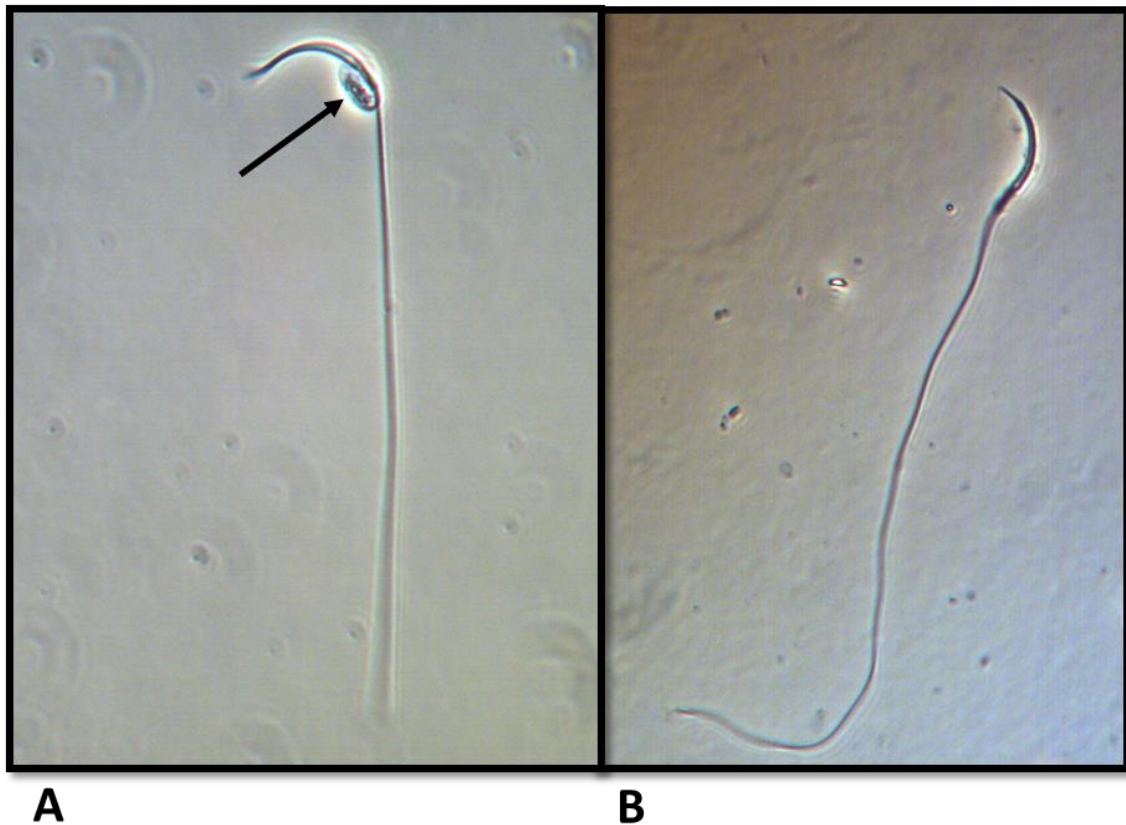


Figura 13. Fotografías obtenidas por microscopia de contraste de fases en las que se muestran espermatozoides epididimarios. **A:** espermatozoide con gota citoplasmática (flecha). **B:** espermatozoide sin gota citoplasmática. 1000X.

De acuerdo con el diseño establecido, donde se planteó agrupar los datos de la presencia de gota citoplasmática en ambas etapas reproductivas independientemente de la fecha, se observó una desviación estándar grande por lo que no hubo diferencias significativas ($F= 0.31$; $P=0.82$); esta desviación se debió, principalmente, a que durante la etapa de reproducción correspondiente a 2015, encontramos pocos espermatozoides con gota citoplasmática (menos del 8%), a diferencia del ciclo del 2016, donde la mayoría de los espermatozoides presentaron gota citoplasmática (más del 40%), por esta razón se decidió graficar el porcentaje de gota citoplasmática por separado (Fig. 14 y 15). Cabe mencionar que, durante el ciclo del 2015, únicamente se analizaron los espermatozoides del epidídimo debido a que en las muestras de testículo existía la duda si se trataba de espermatozoides con gota citoplasmática o de espermátidas.

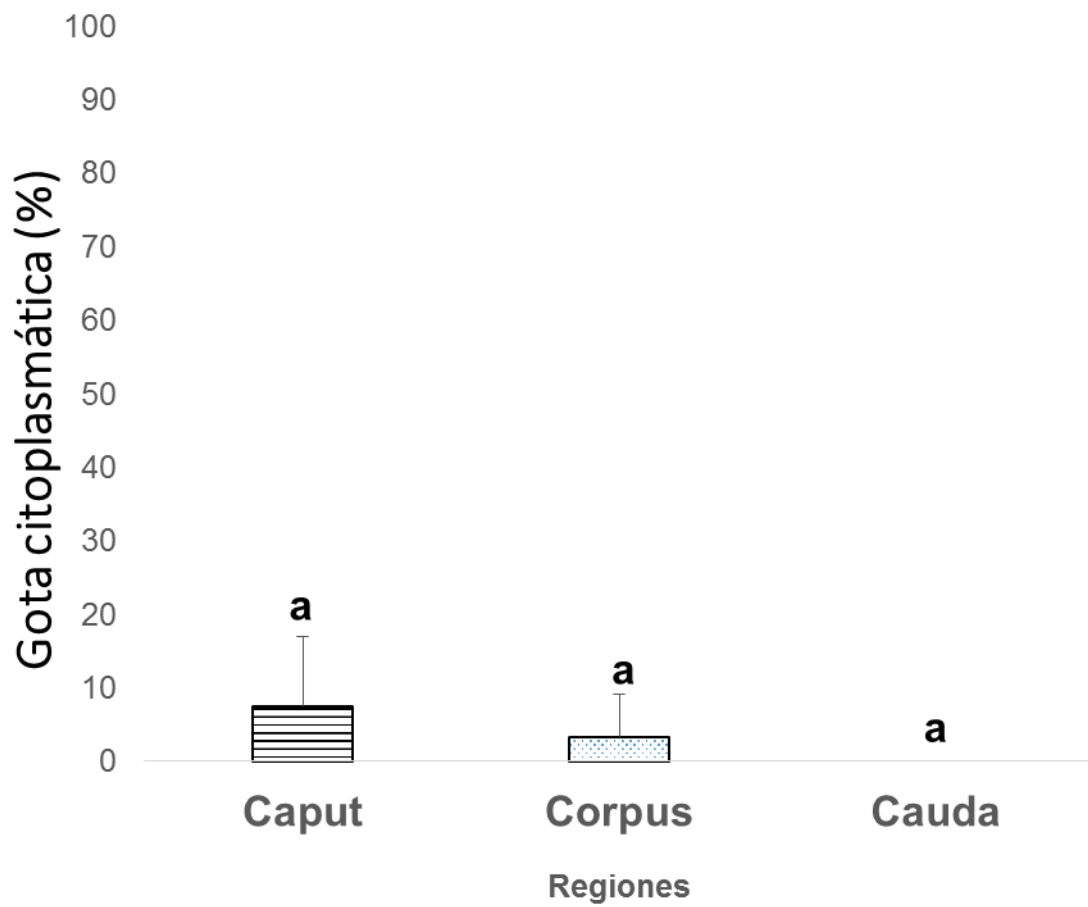


Figura 14. Presencia de gota citoplasmática (%) de espermatozoides extraídos de Caput, corpus y cauda del epidídimo de *S. siniferus* durante el ciclo 2015. Promedio \pm DE. No hay diferencias significativas entre regiones, ANOVA, $F = 1.01$, $P = 0.4$, $n = 3$

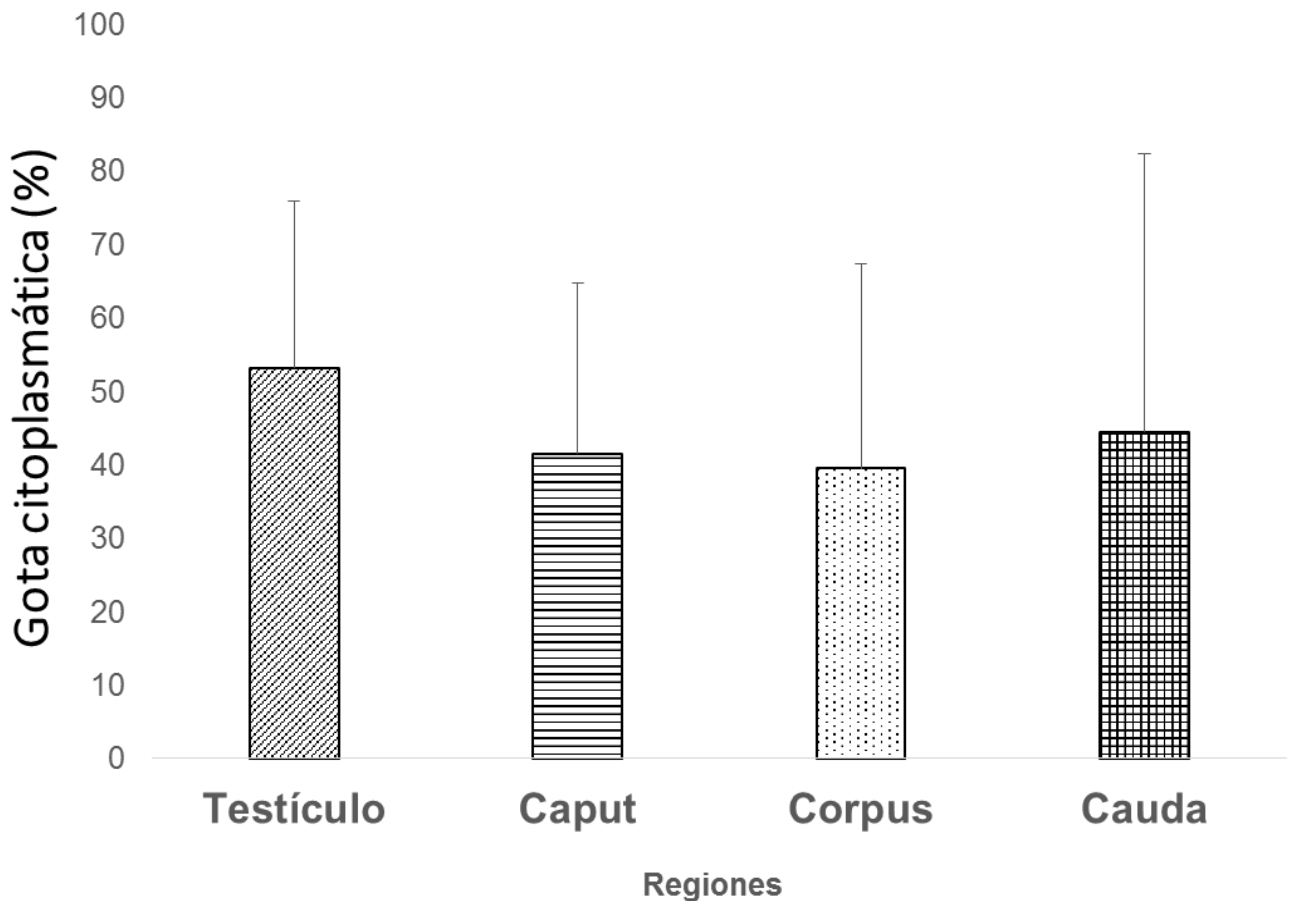


Figura 15. Presencia de gota citoplasmática de espermatozoides extraídos de testículo, caput, corpus y cauda del epidídimo de *S. siniferus* durante el ciclo 2016. $\bar{x} \pm DS$. No hay diferencias significativas entre regiones, ANOVA, $F=0.18$, $P=0.9$, $n=4$

En el 2016, la mayoría de los espermatozoides presentaron problemas en la migración de la gota citoplasmática (Fig. 15). Evidencias recientes indican que los espermatozoides de *S. mucronatus* no presentan migración de la gota citoplasmática entre la región proximal y distal del epidídimo después de 15 horas de incubación en diferentes medios, que se sabe son utilizados en mamíferos para inducir la movilidad (Rodríguez-Tobón., *et al.*, datos no publicados). Los estudios en los mamíferos, indican que la pérdida de la gota citoplasmática en el epidídimo, se relaciona con una movilidad mayor y con la maduración. En mamíferos, el aumento de temperatura ocasiona problemas en la migración de la gota citoplasmática (Bonet *et al.*, 1992) y dado que los reptiles dependen de la temperatura ambiental, el aumento de temperatura, quizás generado por el cambio climático pudiera colaborar para que la gota citoplasmática no migre. Esto se apoya con los registros de la temperatura ambiental durante los meses de

captura que, en promedio fue de 26°C de mayo a julio de 2015 y 29°C en el 2016, mientras que la temperatura cloacal de las lagartijas fue de 28°C y 34°C en 2015 y 2016 respectivamente, por lo tanto, el incremento en la temperatura, tanto ambiental como cloacal, parece estar incidir en la falta de migración de la gota citoplasmática en los espermatozoides de esta especie, sin embargo, hacen falta más estudios al respecto.

Como ya se mencionó, la temperatura es importante para eliminar la gota citoplasmática, ya que un aumento de ésta afectará su migración (Bedford *et al.* 1982). En los mamíferos, la evidencia indica que una temperatura menor a la temperatura corporal es necesaria para alcanzar una espermatogénesis apropiada (Setchell, 1998) o para que los espermatozoides se almacenen, viables, en el segmento distal del epidídimo (Foldes y Bedford, 1982). Y de acuerdo a lo reportado por Gavaud (1991), la exposición a temperaturas fluctuantes en reptiles es importante para completar el ciclo de testículo (Gavaud, 1991).

Probablemente los testículos y epidídimos de los reptiles necesiten, de manera similar a los mamíferos, estar expuestos a temperaturas más bajas (por debajo de las temperaturas preferidas), para completar la maduración de los espermatozoides, ya que se ha reportado que durante un año de temperaturas muy calientes, algunas poblaciones de *Sceloporus mucronatus* no fueron capaces de reproducirse, debido, quizá, a que, las temperaturas altas retardan la vitelogénesis, así como la espermatogénesis (Rodríguez-Romero y Méndez de la Cruz 2004; Sinervo *et al.*, 2010), o que el espermatozoide no ha completado el proceso de maduración en el testículo o epidídimo (Méndez de la Cruz *et al.*, 2014). Sin embargo, estos aspectos son motivo de otros estudios.

A pesar de que varias patologías están relacionadas con la migración de la gota citoplasmática (Bonet *et al.*, 1992), el espermatozoide debe eliminar la gota para adquirir la movilidad progresiva y para ser capaz de fertilizar al ovocito (Méndez de la Cruz *et al.*, 2014).

Considerando que el análisis microscópico tradicional de los espermatozoides no es suficiente para determinar su estado de maduración o la capacidad de fertilizar, es necesario evaluar variables bioquímicas como la distribución de carbohidratos

y la fosforilación de residuos de tirosina, las cuales se encuentran asociadas con el proceso de maduración espermática epididimaria, la primera debido a la importancia como mediador de la adhesión entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito (Chandra *et al.*, 2008), además de que las glicoproteínas están implicadas en la activación de tirosin cinasas que participan en la activación de la fosforilación, evento que a su vez regula las proteínas flagelares implicadas en la movilidad y capacidad de fecundación de ovocitos (Lewis y Aitken 2001; Naz y Rajesh 2004; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015).

8.6 Distribución de carbohidratos

Una vez marcados con lectinas-FITC los espermatozoides obtenidos de testículo y de las regiones del epidídimo, se reconocieron siete tipos de patrones de residuos de azúcares en la membrana del espermatozoide (Fig. 16): a) “Sin fluorescencia”, correspondiente a los espermatozoides que no mostraron ningún marcaje; b) “Completo”, los cuales presentaron un marcaje uniformemente a lo largo de todo el espermatozoide; c) “Heterogéneo”, los espermatozoides que mostraron el marcaje a lo largo de todo el espermatozoide pero éste no era uniforme; d) “Cabeza”, correspondiente a los espermatozoides que mostraron marcaje únicamente en la cabeza; e) “Región acrosomal (RA)”, los espermatozoides que presentaron marcaje en el acrosoma; f) “Pieza media (PM)”, los que mostraron marcaje en la pieza media del espermatozoide; y g) “Región acrosomal más pieza media (RA+ PM)”, correspondiente a los espermatozoides que presentaron marcaje tanto en el acrosoma como en la pieza media. Estos diferentes patrones de distribución se encontraron en el testículo y en las diferentes regiones del epidídimo.

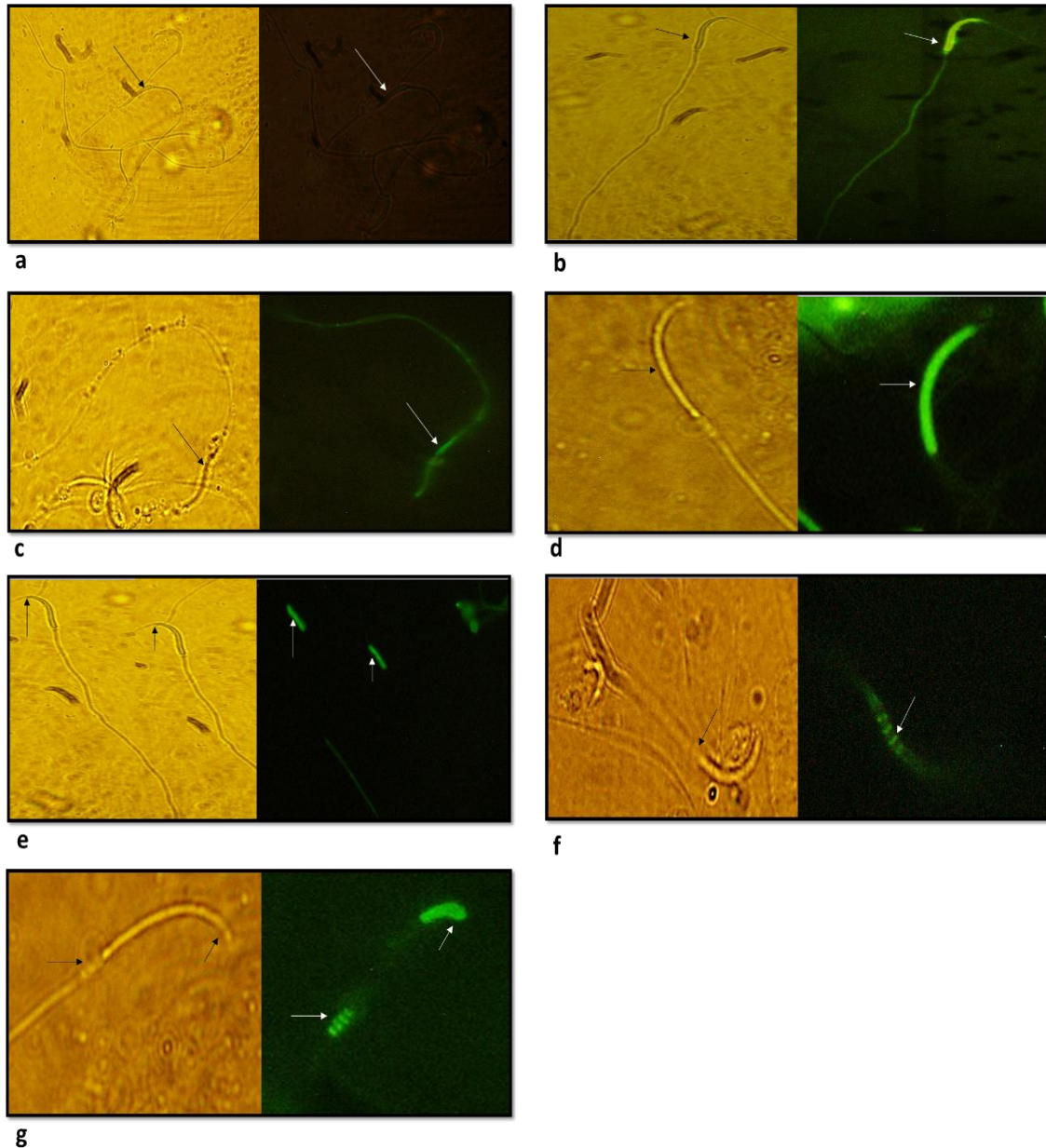


Figura 16. Diferentes patrones de distribución de carbohidratos (manosa y N-acetil glucosamina y/o ácido siálico) en la membrana de espermatozoides obtenidos de testículo y epidídimo de *S. siniferus*. a) "Sin fluorescencia". b) "Completo". c) "Heterogéneo". d) "Cabeza". e) "Región acrosomal (RA)". f) "Pieza media (PM)". g) "Región acrosomal más pieza media (RA+ PM)". Imágenes de la izquierda corresponden a los espermatozoides observados en campo claro, 1000X Imágenes de la derecha corresponden a espermatozoides observados en microscopía de epifluorescencia, 1000X. Las flechas indican la región donde se presenta la fluorescencia correspondiente a la presencia de los carbohidratos marcados.

Para analizar los cambios en la distribución de carbohidratos que sufre el espermatozoide de *S. siniferus* durante su paso por el epidídimo, se determinó la proporción de células (Tabla 2-3) que mostraron cada uno de los tipos de distribución antes descritos (Fig. 16).

Los resultados mostraron que existe una clara distribución de carbohidratos (ácido siálico y/o N-acetilglucosamina y manosa) (Tabla 2-3), a lo largo del espermatozoide a excepción de los residuos de fucosa, los cuales no pudieron ser detectados mediante microscopia de epifluorescencia.

N-acetilglucosamina y/o ácido siálico				
Patrón de distribución	Test	Epididimo		
		Cap	Cor	Cau
Sin fluorescencia	41.7±45.1 a	14.9±28.4 a	7.4±16.8 a	7.7±19.9 a
Cabeza	3.6 ±11.4 a	0± 0 b	0± 0 b	0± 0 b
Completo	30.5 ± 39.3 a	37 ± 36.5 a	56.4 ± 40.7 a	54.1 ± 42.2 a
Pieza media (PM)	1.9 ± 4.0 a	3.3 ± 6.1 a	6.8 ± 15.4 a	6.3 ± 14.3 a
Heterogéneo	0.3 ± 1.2 a	20.2 ± 37.3 a	9.7 ± 27.3 a	17.5 ± 37.7 a
Región acrosomal (RA)	10.2 ± 18.0 a	7.4 ± 11.5 a	1.4 ± 2.9 a	2.7 ± 6.1 a
RA+ PM	9.4 ± 14.8 a	17.0 ± 24.5 a	16.9 ± 30.1 a	9.8 ± 29.9 a

Tabla 2. Distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, en la membrana de espermatozoides obtenidos de testículo (Test), caput (Cap), corpus (Cor) y cauda (Cau) del epidídimo de *S. siniferus* reconocidos por microscopia de fluorescencia. Mediana ± DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las regiones. Kruskal Wallis seguido de Z-Kruskal-Wallis, $p < 0.05$. $n=13$ lagartijas.

Manosa				
Patrón de distribución	Test	Epididimo		
		Cap	Cor	Cau
Sin fluorescencia	78.9 ± 32.1 a	78.5 ± 32.8 a	74.0 ± 36.6 a	77.3 ± 38.3 a
Cabeza	2.5 ± 6.2 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0.08 ± 0.2 a
Completo	2.5 ± 8.6 a	11.6 ± 25.8 a	13.6 ± 25.0 a	17.5 ± 36.2 a
Pieza media (PM)	0 ± 0 a	0.08 ± 0.2 a	0 ± 0 a	0.08 ± 0.2 a
Heterogéneo	0.8 ± 1.9 a	5.6 ± 13.2 a	9.5 ± 30.0 a	3.9 ± 12.3 a
Región acrosomal (RA)	15.2 ± 29.8 a	3.9 ± 11.4 a	1.4 ± 3.3 a	0.08 ± 0.2 a
RA+ PM	0 ± 0 a	0.08 ± 0.2 a	0 ± 0 a	1 ± 3.4 a

Tabla 3. Distribución de manosa, en la membrana de espermatozoides obtenidos de testículo (Test), caput (Cap), corpus (Cor) y cauda (Cau) del epidídimo de *S. siniferus* reconocidos por microscopía de fluorescencia. Mediana ± DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las regiones. Kruskal Wallis seguido de Z-Kruskal-Wallis, $p < 0.05$. $n=13$ lagartijas.

En el caso de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, fue mayor el porcentaje de espermatozoides que presentaron el tipo de distribución “completo”, lo que indica que los espermatozoides que transitaron del testículo al epidídimo, contienen estos residuos de azúcares principalmente en toda la célula (Tabla 2).

Aunque los carbohidratos analizados por microscopía de fluorescencia, mostraron una redistribución específica para cada región, no se observaron diferencias significativas entre regiones, para ningún tipo de distribución, con excepción del

tipo de distribución “cabeza”, el cual está presente en los espermatozoides de testículo (3.9%) y ausente en los de epidídimo, debido a que este porcentaje, es muy bajo, creemos que este tipo de distribución en “cabeza” no representa un significado biológico, sin embargo posteriormente se pueden realizar más estudios para comprobar dicha hipótesis (Tabla 2).

La manosa se observó distribuida a todo lo largo del espermatozoide, ya que el tipo de distribución “completo”, fue el único que se presentó mayormente en los espermatozoides que transitaron del testículo al epidídimo, por el contrario, el tipo de distribución “RA” disminuyó durante el tránsito de testículo hacia el epidídimo, y en el resto se observa una distribución constante entre las diferentes regiones evaluadas. Aunque se aprecian estas tendencias al aumento y disminución en los patrones, ninguna distribución presenta diferencias estadísticamente significativas, cuando los espermatozoides pasan del testículo al epidídimo (Tabla 3).

El índice de fluorescencia (IF) estimado con base en los datos obtenidos mediante citometría de flujo, mostró que a partir de los espermatozoides que ingresaron a la región del corpus y posteriormente a la cauda del epidídimo, aumentó la cantidad de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico presente en los espermatozoides (Fig. 17).

La manosa se mantuvo constante sin diferencias significativas entre las regiones analizadas $F= 1.86$ $p= 0.163413$ (Fig. 17). Finalmente, la fucosa que no se logró reconocer por microscopía de epifluorescencia, tuvo un IF bajo y no se determinaron diferencias significativas entre regiones $H= 2.324419$ $P= 0.507859$.

En la figura 17, se observa que la cantidad de lectina UEA que se une a fucosa en espermatozoides, fue significativamente menor que la que se encontró con las lectinas WGA y Con-A. A diferencia de lo observado por microscopía de epifluorescencia, en el estudio realizado mediante citometría de flujo se pudieron detectar diferencias significativas entre el testículo y las regiones del epidídimo, posiblemente esto es consecuencia del método, ya que por citometría de flujo se contabilizaron 10,000 células mientras que en microscopía de epifluorescencia solo 100 células.

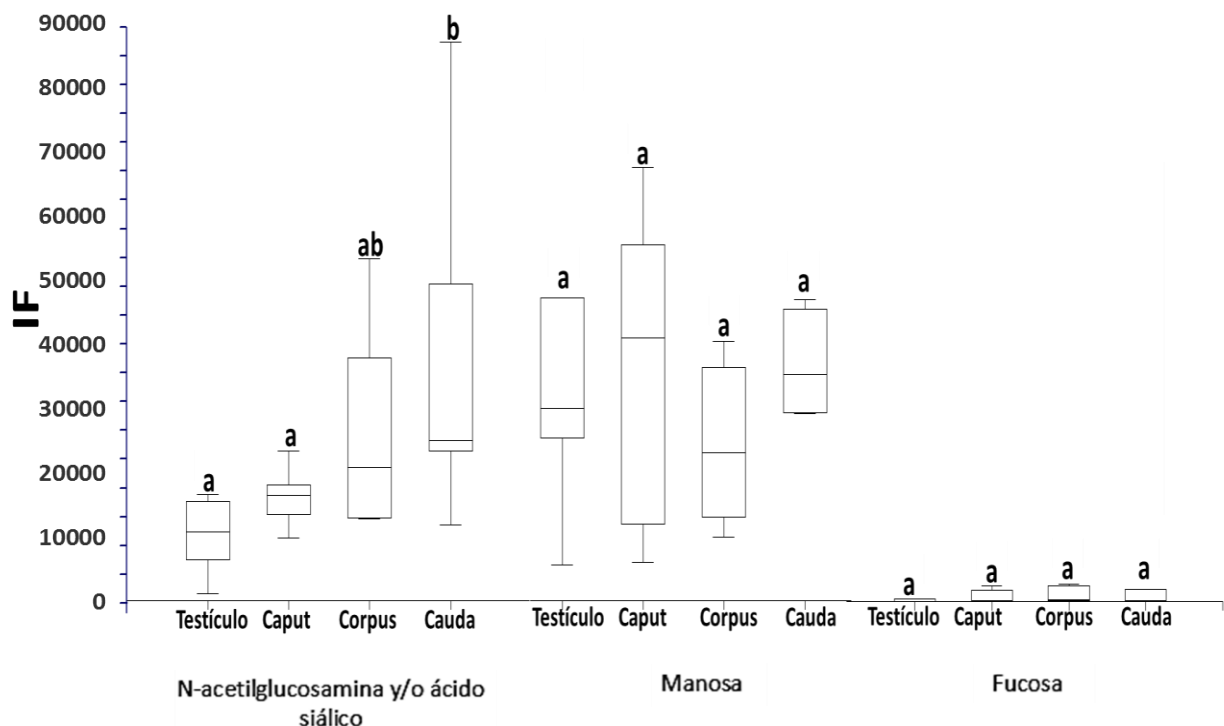


Figura 17. Índice de fluorescencia en espermatozoides obtenidos de testículo y de las diferentes regiones del epidídimo (caput, corpus, cauda), por citometría de flujo. Las barras indican la distribución de los datos observados con respecto a la mediana. Letras diferentes señalan diferencias significativas entre regiones. Kruskal Wallis seguido de Z-Kruskal-Wallis, $p < 0.05$. $n=13$.

En espermatozoides obtenidos de testículo y epidídimo de lagartijas no se habían realizado estudios para determinar la presencia y distribución de los residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa presentes en la membrana plasmática, y determinar cambios en su distribución en el espermatozoide; cambios que podrían estar relacionados con el proceso de maduración espermática.

Los resultados obtenidos en esta investigación, se pueden comparar con lo que se ha reportado para algunas especies de mamíferos, ya que las modificaciones postraduccionales como las glicosilaciones, son procesos que se conservan a nivel evolutivo en las diferentes especies animales. En mamíferos, se ha observado que los carbohidratos de membrana se encuentran distribuidos en diferentes regiones del espermatozoide y sufren una redistribución mientras transitan por las diferentes regiones del epidídimo dependiendo de la especie

(Kumar *et al.*, 1990; Navaneetham *et al.*, 1996). Por ejemplo, en espermatozoides de verraco, se ha reportado la presencia de N-acetilglucosamina y ácido siálico usando la lectina WGA, aunque la distribución de estos carbohidratos se limita a la superficie de espermatozoides eyaculados principalmente alrededor de la cabeza y de la cola (Jiménez *et al.*, 2003).

Otros estudios como el de Navaneetham *et al.*, (1996) reportaron que en mono Rhesus, la mayoría de los espermatozoides del caput del epidídimo (68.3%), marcados con WGA-FITC, mostraron parches aislados de fluorescencia en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide, mientras que una proporción pequeña (20.1%) mostró fluorescencia irregular solamente en el acrosoma. Dichos resultados no coinciden con los encontrados en esta investigación, ya que en el presente trabajo se encontró que la mayoría de espermatozoides de caput de epidídimo (37%) presentaron marcaje uniforme para WGA-FITC en toda la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide (tipo de distribución “completo”) y solo un 7.4% de espermatozoides de caput del epidídimo lo presentaron en la región acrosomal.

El acrosoma, es rico en carbohidratos, particularmente ácido siálico (Kopečný y Flechon, 1981), lo que correlaciona con nuestro hallazgo de una marca con WGA en la región acrosomal evidente en los espermatozoides, sin mostrar diferencias significativas entre testículo y ninguna región del epidídimo (Clermont y Tang, 1985) lo explican por las distribución de glicoproteínas en el acrosoma, que puede ocurrir desde la espermatogénesis, momento en el que las glicoproteínas son transferidas del aparato de Golgi al acrosoma.

En el corpus del epidídimo del mono Rhesus, 52% de espermatozoides muestran la localización de WGA-FITC en la región postacrosomal, pieza intermedia y cola (Navaneetham *et al.*, 1996), mientras que los resultados observados en *S. siniferus*, mostraron que en el corpus la mayoría de espermatozoides (56.4%) presentan el tipo de distribución “completo”, lo que indica que en el espermatozoide de esta lagartija los residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico se distribuyen uniformemente a lo largo de toda la célula.

En la cauda del epidídimo, de mono Rhesus se reportó una localización uniforme de WGA en la mayoría de los espermatozoides (70%) (Navaneetham *et al.*, 1996), resultados que son similares a los encontrados en esta investigación, donde un gran porcentaje de los espermatozoides (54%) en dicha región del epidídimo, presentaron una localización uniforme de N-acetilglucosamina y ácido siálico (“completo”).

Toyonaga *et al.*, (2011) reportan, en gatos, la presencia de N-acetil-D-glucosamina por medio de WGA-FITC, en toda la cabeza de los espermatozoides tanto de testículo como en caput, corpus y cauda del epidídimo, lo cual no coincide con lo observado en esta investigación para *S. siniferus*, pues solo hay 3.6% de espermatozoides con fluorescencia en toda la cabeza de los espermatozoides de testículo, mientras que en ninguna de las regiones del epidídimo se presentó N-acetilglucosamina distribuido en cabeza.

Rodríguez-Tobón (2016), reportó que en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, hay una variación en los patrones de fluorescencia dependiendo de la fecha de estudio. La lectina WGA se fijó en un porcentaje elevado de espermatozoides, en la región postacrosomal, en espermatozoides de las tres regiones del epidídimo de organismos colectados en septiembre, mientras que en los colectados en octubre, se incrementaron las células que presentaron señal en el acrosoma y en la región ecuatorial, encontrando diferencias significativas entre espermatozoides de la región caudal con respecto a los de la caput y el corpus del epidídimo. Dichos resultados varían de los encontrados en *S. siniferus*, ya que aquí, no se observó distribución de carbohidratos en la región postacrosomal, ni en la región ecuatorial y menos del 7% presentaron señal en el acrosoma de los espermatozoides del epidídimo.

Los espermatozoides tratados con la lectina Con A, la cual se une principalmente a residuos de manosa, mostraron los mismos siete diferentes tipos de distribución. En más del 50% de los espermatozoides no se encontró manosa en ninguna de las regiones evaluadas. El porcentaje del tipo de distribución “completo”, aumentó en los espermatozoides provenientes del epidídimo con respecto a los testiculares y de igual forma, en este hay un aumento de caput a

cauda. También se observó que la distribución de manosa en “cabeza” “RA” y “RA+PM” disminuye del testículo al epidídimo (Tabla 3). Estos hallazgos sugieren que, probablemente, este carbohidrato no es esencial para los espermatozoides que transitan a través del epidídimo, ya que más del 50% de espermatozoides no presentaron residuos de manosa en la membrana.

Lo reportado para mono Rhesus, es similar a los resultados de esta investigación, ya que la mayoría de los espermatozoides del caput y cauda del epidídimo no mostraron fluorescencia, sin embargo en mono Rhesus, el resto de los espermatozoides del caput y la mayoría de los del corpus del epidídimo muestran parches en la cabeza, pieza intermedia, y pieza principal, y solo una parte de los espermatozoides de cauda mostraron marcaje en el acrosoma (Navaneetham *et al.*, 1996), lo que no coincide con lo observado en *S. siniferus*.

En verraco, la manosa, se distribuye en la cabeza y pieza media de los espermatozoides (Jiménez *et al.*, 2003), coincidiendo con los resultados obtenidos en los espermatozoides de *S. siniferus*. En cambio, los reportes para gato mostraron ausencia de señal para manosa en espermatozoides de testículo y presencia de ella en espermatozoides de las tres regiones del epidídimo (Toyonaga *et al.* 2011), lo que difiere en gran parte con lo encontrado en *S. siniferus*, pues en esta lagartija predominó la falta de manosa en los espermatozoides de todas las regiones evaluadas.

En los espermatozoides del murciélago *C. mexicanus*, Rodríguez-Tobón (2016), observó que la manosa es distribuida a todo lo largo del espermatozoide, en la cauda del epidídimo, siendo menos intenso en la región postacrosomal y conforme pasaba el tiempo de almacenamiento, este azúcar se encontraba sólo en la cabeza del espermatozoide. Estos resultados coinciden en parte con los encontrados en *S. siniferus*, donde los espermatozoides de la cauda del epidídimo, mostraron manosa distribuida a lo largo del espermatozoide (17%), aunque no se observaron cambios con el paso del tiempo de almacenamiento como ocurrió en el murciélago.

La fucosa no pudo detectarse en los espermatozoides de ninguna de las regiones evaluadas en *S. siniferus*. Estos resultados son similares a los que se han reportado para los espermatozoides eyaculados de verraco, donde la fucosa

mostró bajo índice de fluorescencia por lo que no fue posible evaluar la muestra por microscopía de fluorescencia (Jiménez *et al.*, 2003). Sin embargo, Toyonaga *et al.*, (2011), reportaron en gato la presencia de fucosa en toda la cabeza de los espermatozoides de caput, corpus y cauda del epidídimo, y ausencia de esta en los espermatozoides testiculares. En cambio, en ratón, Baker *et al.*, (2003) reportaron unión de UEA en la parte posterior de la cabeza de espermatozoides eyaculados, así como en la membrana del acrosoma en forma de media luna, lo cual no coincide con lo observado en *S. siniferus*. Por otra parte, en el murciélago *C. mexicanus*, Rodríguez-Tobón (2016), reportó la presencia de fucosa, pero en menor medida que N-acetilglucosamina y manosa, tal como se encontró en este estudio.

Tulsiani, *et al.*, (2003), reportaron en rata, que la actividad enzimática de sialiltransferasa disminuyó mientras los espermatozoides se trasladan desde el caput proximal a la cauda distal del epidídimo, sugiriendo que, la sialilación (incorporación del ácido siálico) de los componentes de la superficie de los espermatozoides, comienza en el caput del epidídimo proximal.

En esta investigación el IF de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, mostraron el valor más elevado, en los espermatozoides de la cauda del epidídimo, lo que podría sugerir que hay actividad de la sialiltransferasa en esta última región. Las glicosiltransferasas y glicohidrolasas son enzimas que modifican glicoproteínas, estas se han reportado en el lumen del epidídimo. Dichas enzimas modifican las glicoproteínas existentes mediante la adición de residuos de azúcar, por lo tanto, se ha sido sugerido que estas enzimas pueden tener un papel en la modificación de glicoproteínas de la superficie del espermatozoide durante la maduración del epidídimo (Tulsiani *et al.*, 2003).

Los resultados de este estudio, comparados con los que se han realizado en varias especies de mamíferos, indican que existe una gran variabilidad en la distribución de los carbohidratos de membrana de los espermatozoides, la cual es especie específica.

Se ha determinado que la porción de carbohidratos de las glicoproteínas, es importante en la interacción del gameto masculino con el ovocito, (Damjanov, 1987; Flesch *et al.*, 1998; Vázquez *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 2003). Sin

embargo en este estudio solo se observaron diferencias significativas entre regiones con N-acetilglucosamina, el cual estuvo presente en la cabeza de los espermatozoides de testículo y ausente en la de los espermatozoides de epidídimo, por lo que se pensaría que este carbohidrato, al parecer, no está involucrado en el reconocimiento de gametos, aunque sugerimos que los carbohidratos y/o las glicoproteínas, podrían estar relacionados con los cambios que sufre el espermatozoide durante la maduración, tales como su participación en la activación de ciertas vías de señalización como la fosforilación de tirosinas.

8.7 Fosforilación en residuos de tirosinas

Al igual que la distribución de carbohidratos, la fosforilación de residuos de tirosinas se obtuvo por microscopía de fluorescencia. Los espermatozoides de las diferentes regiones evaluadas presentaron cuatro diferentes tipos de distribución de residuos de tirosina fosforilados: a) “sin fluorescencia” correspondiente a los espermatozoides que no presentaron fluorescencia; b) “completo”, los que presentaron fluorescencia a lo largo de toda la célula; c) “cabeza”, en el cual solo la cabeza del espermatozoide se marcó y d) “región acrosomal”, donde se observó señal positiva en la región acrosomal de los espermatozoides, (Fig. 18), presentaron cambios entre las regiones evaluadas (Tabla 4).

La distribución “sin fluorescencia” en los espermatozoides del testículo y de las tres regiones del epidídimo fue alta, sin haber diferencias significativas entre regiones $H= 0.4750966$, $P= 0.924328$ (Tabla 4). Aparentemente a nivel de “cabeza” y “acrosoma”, los espermatozoides del corpus del epidídimo mostraron mayor fosforilación de los residuos de tirosina, pero este aumento tampoco presentó diferencias significativas con las demás regiones evaluadas (Tabla 4). Únicamente se presentaron diferencias significativas con el tipo de distribución “completo”, donde se observó que los espermatozoides obtenidos del corpus del epidídimo fueron los únicos que presentaban fosforilación en residuos de tirosinas (Tabla 4).

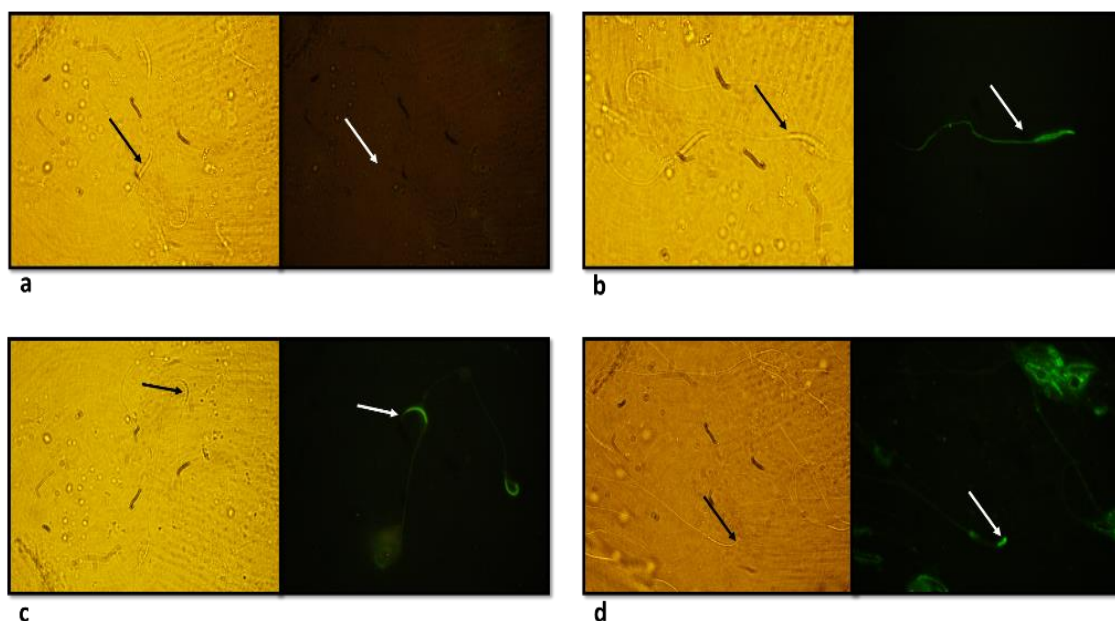


Figura 18. Distribución de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de espermatozoides obtenidos de testículo y epidídimo de *S. siniferus*
a) “Sin fluorescencia”. **b)** “Completo”. **c)** “Cabeza”. **d)** “Región acrosomal (RA)”.
 Imágenes de la izquierda corresponden a los espermatozoides observados en campo claro. 1000X. Imágenes de la derecha corresponden a espermatozoides observados en microscopía de epifluorescencia. 1000X. Las flechas indican la región donde se presenta la fluorescencia correspondiente a la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.

Fosforilación de tirosinas	Testículo	Caput	Corpus	Cauda
a) Sin fluorescencia	^a 76.7 ± 11.9	^a 55.1 ± 13.5	^a 33.5 ± 13.9	^a 64.7 ± 15.2
b) Completo	^a 0 ± 0	^a 0 ± 0	^b 14.2 ± 14.2	^a 0 ± 0
c) Cabeza	^a 0 ± 0	^a 11.4 ± 11.4	^a 18.5 ± 13.1	^a 0.1 ± 0.1
d) Región acrosomal	^a 23.2 ± 11.9	^a 33.4 ± 10.2	^a 39.1 ± 13.9	^a 35.1 ± 15.2

Tabla 4. Porcentaje de cada uno de los diferentes patrones de fosforilación de residuos de tirosina de espermatozoides obtenidos de testículo y de las diferentes regiones del epidídimo (caput, corpus y cauda) de la lagartija *S. siniferus*. Mediana ± DE. Letras indican diferencias significativas entre las regiones. Kruskal Wallis, seguido de Z- Kruskal Wallis. $p < 0.05$. $n=13$ lagartijas

Aunque la mayoría de los tipos de distribución (“sin fluorescencia”, “región acrosomal” y “cabeza”), de los residuos de tirosinas fosforiladas, entre las regiones evaluadas no mostraron diferencias significativas, se observó que la cantidad de fosforilación de los residuos de tirosina en los espermatozoides obtenidos del corpus del epidídimo se incrementa significativamente (Fig. 19). Este aumento de la fosforilación de los residuos de tirosina en los espermatozoides de la región del corpus coincidió con el incremento de la N-acetil glucosamina y ácido siálico y con el incremento de la movilidad espermática, estos eventos correlacionan en el tiempo y podrían estar implicados en el desarrollo de la movilidad de los espermatozoides del corpus del epidídimo.

FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINAS

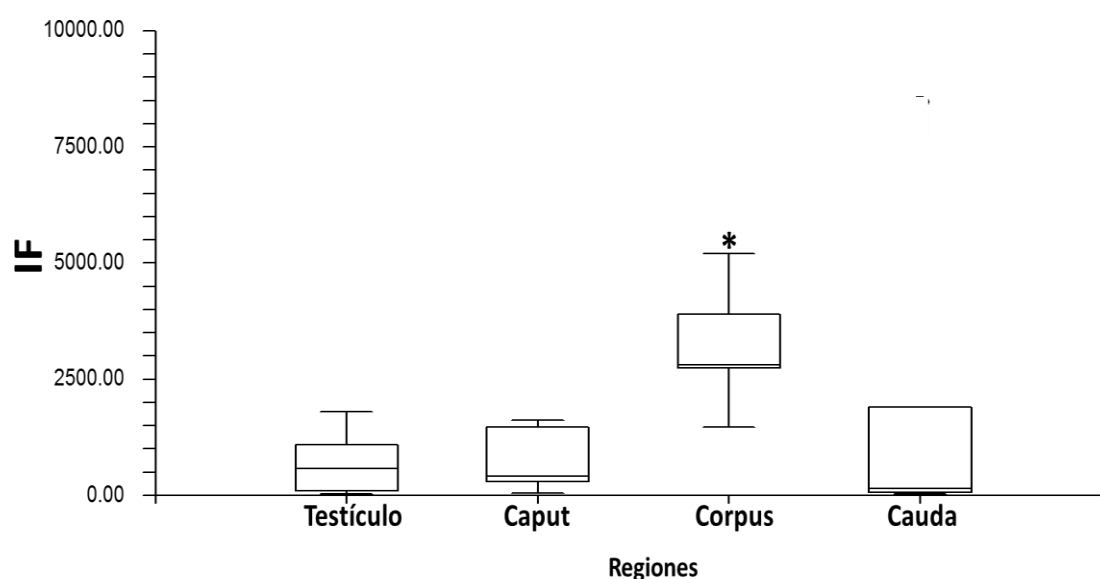


Figura 19. Índice de fluorescencia (IF) de proteínas con fosforilación en residuos de tirosina (Ac. Anti PY20-FITC) de espermatozoides obtenidos de testículo y de la región proximal, media, y distal de epidídimo de *S. siniferus* reconocidos por citometría de flujo. Las barras indican la distribución de los datos observados con respecto a la mediana. * indica diferencias significativas entre regiones. Kruskal Wallis, seguido de Z-Kruskal-Wallis, $p < 0.05$. $n=13$

Se ha reportado que la fosforilación de proteínas en los residuos de tirosinas, se encuentra asociado con el proceso de maduración epididimaria, permitiendo a las proteínas que encontramos en el espermatozoide, encender o apagar alguna función (Lewis y Aitken, 2001; Naz y Rajesh, 2004; Rodríguez-Tobón, 2016), razón por la cual en el presente estudio se determinaron los cambios en la fosforilación de los residuos de tirosina de los espermatozoides de la lagartija *S. siniferus* con respecto al sitio en que se encuentran y su correlación con la maduración espermática.

En los espermatozoides de *S. siniferus* los residuos de tirosina fosforilados, que forman parte de todas las proteínas del espermatozoide, se encontraron en el flagelo, en la cabeza y en la región acrosomal. Estos resultados pueden compararse con el trabajo de Lewis y Aitken (2001) quienes mostraron, mediante análisis inmunocitoquímico, que en los espermatozoides de rata, la fosforilación de residuos de tirosina se presentó a nivel del acrosoma, que la mayor actividad se halló en espermatozoides del caput del epidídimo, y disminuyó conforme los espermatozoides se dirigían a la cauda del epidídimo, mientras que en los espermatozoides de la lagartija la mayor fosforilación de residuos tirosina, en la región acrosomal, ocurrió cuando los espermatozoide se encontraban en el corpus del epidídimo. Se ha reportado que las proteínas involucradas con el reconocimiento del ovocito, se encuentran en la región del acrosoma (Baker *et al.*, 2006; Salicioni *et al.*, 2007), por tal razón, se podría pensar que estas proteínas pudieran estar involucradas en este proceso de reconocimiento.

Por otra parte, en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, se reportó que hubo un aumento en los residuos de tirosinas fosforilados, principalmente en la pieza principal del flagelo, lo que indica que la activación de proteínas que se encuentran en el flagelo de espermatozoides, están relacionadas con la adquisición de su capacidad para moverse progresivamente (Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015). Estos resultados difieren de los encontrados en *S. siniferus* donde la fosforilación de residuos de tirosina no fue exclusiva del flagelo. Sin embargo, la fluorescencia observada a lo largo de todo el espermatozoide, permite considerar que las proteínas que se fosforilan a nivel de flagelo, podrían estar relacionadas con la adquisición de la movilidad del espermatozoide como parte del proceso de

maduración epididimaria (Lewis y Aitken, 2001; Fabrega *et al.*, 2011; Fabrega *et al.*, 2012). Cabe destacar que los espermatozoides de la región del corpus del epidídimo son los únicos que muestran este tipo de distribución, por lo que se piensa que, en esta región del epidídimo, los espermatozoides están sufriendo cambios bioquímicos importantes que, posteriormente, podrían reflejarse en la capacidad de fertilización del espermatozoide.

Lin *et al.* (2006) reportaron que la entrada de los espermatozoides en el epidídimo se acompaña de la activación súbita de la vía de la fosforilación de residuos de tirosina, inicialmente en la pieza principal y, posteriormente, en la pieza media del espermatozoide de ratón. Posteriormente, se observó un patrón en el dominio del acrosoma, mientras los espermatozoides entran en el caput del epidídimo y esta fosforilación se mantiene alta hasta que entran en la región del corpus distal y la cauda (Lin *et al.*, 2006). En dicho estudio, los autores mostraron que la fosforilación de residuos de tirosina que se encontró en los espermatozoides del murino, se adquiere, sólo cuando las células germinales masculinas se diferenciaron en espermatozoides y entraron en el epidídimo, donde son capaces de responder al aumento en la fosforilación de residuos de tirosina en la pieza principal del flagelo. Estos resultados pueden semejarse a lo observado en *S. siniferus*, ya que, a pesar de que se detectó la presencia de fosfotirosina en espermatozoides de testículo, esta era muy poca con respecto a lo observado en caput, corpus y cauda del epidídimo.

Estos hallazgos ayudan a aclarar los cambios bioquímicos asociados con la maduración funcional de los espermatozoides durante el tránsito del epidídimo ya que se ha reportado que la fosforilación de residuos de tirosina, es fundamental para el logro de un estado capacitado y la expresión de la movilidad hiperactivada (Visconti *et al.* 1995; Flesch *et al.*, 1999; Lewis y Aitken 2001; Olds-Clarke, 2003; Urner y Sakkas, 2003; Naz y Rajesh 2004; Roy y Atreja, 2008; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que la N-acetil glucosamina localizada en los espermatozoides del corpus del epidídimo de la lagartija *S. siniferus* podría estar involucrada en la activación de la tirosina cinasa, la cual por el proceso de fosforilación activa el mecanismo flagelar que permite la

movilidad del espermatozoide, por lo que estos cambios nos sugieren que en los espermatozoides del corpus del epidídimo se está llevando a cabo el proceso de maduración espermática epididimaria en esta especie.

9 CONCLUSIONES

Las lagartijas macho adultos de *Sceloporus siniferus* tienen un patrón reproductivo estacional, presentan manchas naranjas en la región gular durante la actividad reproductiva, producen espermatozoides en el testículo de abril a septiembre y los almacenan en el epidídimo de mayo a septiembre.

Los espermatozoides obtenidos de la región corpus del epidídimo tienen más N-acetilglucosamina y ácido siálico al igual que una cantidad mayor de fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas, lo que se relaciona con un incremento en la movilidad espermática a partir de esta región. Con los datos obtenidos se muestra que estos cambios correlacionan con la maduración espermática epididimaria en la lagartija *Sceloporus siniferus*.

10 PERSPECTIVAS

El presente trabajo determino mediante pruebas bioquímicas, la existencia del proceso de maduración de los espermatozoides en el epidídimo de la lagartija *Sceloporus siniferus*, aportando un conocimiento muy importante para el grupo de los reptiles, lo que permite ampliar el panorama general para comprender mejor la fisiología reproductiva de esta especie.

Sin embargo, este trabajo da pauta a seguir realizando investigación sobre procesos que aún no han sido aclarados, ente ellos, es indispensable determinar la concentración de testosterona durante todo el ciclo reproductivo, para observar como este afecta las características del epitelio del epidídimo ya que este es un órgano andrógeno dependiente. La cuantificación de testosterona también es importante para analizar los cambios de coloración de la lagartija durante la época de reproducción con la finalidad de conocer a detalle sus características reproductivas.

Por otro lado, falta determinar si el incremento en la temperatura, tanto ambiental como cloacal, incide en la falta de migración de la gota citoplasmática en los espermatozoides de esta especie.

De igual manera se debe comprobar la hipótesis sobre la activación de la tirosina cinasa a través de glicoproteínas, para reconocer si por esta vía se activa la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas.

Los resultados obtenidos del presente estudio, permiten llevar a la aplicación los conocimientos fisiológicos y bioquímicos en técnicas de reproducción asistida, comenzando por comprobar la fertilización con espermatozoides extraídos a partir del corpus del epidídimo, lo que ayudaría posteriormente a generar o implementar protocolos de criopreservación de espermatozoides y fertilización in vitro.

11 BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Aitken, R. J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A.J., Lee, Y.H. y Baker, M.A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian Journal of Andrology* 9(4), 554-564.
- ✓ Akbarsha, M.A., Kadalmani, B. y Tamilarasan, V. (2006). Histological variation along and ultrastructural organization of the epithelium of the ductus epididymidis of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana* Cuvier. *Acta Zoológica (Stockholm)* 87, 181–196.
- ✓ Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (2002). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.
- ✓ Anderson, M. (1994). *Sexual Selection*. New Jersey: Princeton University, Press.
- ✓ Aranha, I., Bhagya, M. y Yajurvedi, H.N. (2008). Concentration of cations in different parts of male reproductive system and their influence on in vitro sperm motility in lizard *Mabuya carinata* Schneider. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46(10), 720-724.
- ✓ Arenas-Ríos, E., León-Galván, M.A. y Rosado, G.A. (2012) Espermatogénesis Maduración y almacenamiento epididimario de espermatozoides en Mamíferos. En: Retana, Márquez, S., *Avances en la Biología de la Reproducción* (p. 13-42). Ciudad de México: UAM_SEP.
- ✓ Awano, M. A., Kawaguchi, y Mohri, H. (1993). Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(2), 375-383.
- ✓ Baker, M.A., Lewis, B., Hetherington, L. y Aitken, R.J. (2003). Development of the signalling pathways associated with sperm capacitation during epididymal maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 64(4), 446-57.
- ✓ Baker, M. A., Hetherington, L., Ecroyd, H., Roman, S.D. y Aitken, R.J. (2004) Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 2), 211-222.

- ✓ Baker, M. A., Hetherington, L. y Aitken, R.J. (2006). Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *Journal of Cell Science*, 119 (Pt 15), 3182-3192.
- ✓ Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M. y Forti, G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 12(5), 323-330.
- ✓ Bedford, J.M., Berrios, M. y Dryden, G.L. (1982). Biology of the scrotum. IV. Testis location and temperature sensitivity. *Journal Experimental of Zoology*, 224(3), 379–388
- ✓ Bedford, J.M. y Kim, H.H. (1993). Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in retrospective analysis of fertilization failure in vitro. *Human Reproduction*, 8(3), 453-463.
- ✓ Belleannee, C., Belghazi, M., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Gatti J.L., Dacheux, J.L. y Dacheux, F. (2011). Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*, 11(10), 1952-64.
- ✓ Belleannee, C., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Gatti, J.L., Dacheux, J.L. y Dacheux, F. (2011). Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *Proteomics*, 74(1), 59-78.
- ✓ Benabib, M. (1994). Reproduction and lipid utilization of tropical populations of *Sceloporus variabilis*. *Herpetological Monographs*, 8, 160–180.
- ✓ Boldt, J. Howe, A.M., Preble, J. (1988). Enzymatic alteration of the ability of mouse egg plasma membrane to interact with sperm. *Biology of Reproduction*, 39 (1), 19–27.
- ✓ Boldt, J. Howe, A.M., Pakerson, J.B., Gunter, L.F., Kuehn, E. (1989). Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. *Biology of Reproduction*, 40(4), 887–896.
- ✓ Bonet, S., Briz, M., Fradera, A. y Egozcue, J. (1992). Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. *Human Reproduction*, 7(4), 523–528.

- ✓ Breitbat, L. y Nass-Arden, L. (1995). Relationship between intracellular calcium, energy metabolism and motility of ram sperm. *Archives of Andrology*, 35(2), 83-92.
- ✓ Bustos, Z.M.G., Castro-Franco, R., Manjarrez, S.J. y Fajardo, G.V. (2014). Variación morfológica asociada a los patrones de color de la garganta, en lagartijas *Sceloporus horridus horridus* (sauria: Phrynosomatidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 30(2), 357-368.
- ✓ Canseco-Márquez, L. y García A. A. (2013). *Sceloporus siniferus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2014.3
- ✓ Carpenter, G. C. (1995). The ontogeny of a variable social badge: throat color development in tree lizards (*Urosaurus ornatus*). *Journal of Herpetology*, 29(1), 7-13.
- ✓ Cervantes, M.I., Arenas-Ríos, E., León-Galván, M.A., López-Wilchis. R., Ambriz, D. y Rosado, A. (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54(4-5), 196-204.
- ✓ Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., y Drevet, J.R. (2010). Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of Animal Science*, 88(4), 1321-1331.
- ✓ Chandra, A., Srinivasan, S.K., Jamal, F., Mehrotra, P.K., Singh, R.L. y Srivastav, A. (2008). Post-translational modifications in glycosylation status during epididymal passage and significance in fertility of a 33 kDa glycoprotein (MEF3) of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Reproduction*, 135 (6), 761–770.
- ✓ Clark, J. D., Baldwin, R. L., Bayne, K. A., Brown, M. J., Gebhart, G. F., Gonder, J. C. y Smith, O. A. (1996). *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, DC: Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, 125.
- ✓ Clermont, Y., y Tang, X.M. (1985). Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. *The Anatomical Record*, 213(1), 33-43

- ✓ Contri, A., A. Gloria, D. Robbe, I. De Amicis, y A. Carluccio. (2012). Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology* 77(1), 166-173.
- ✓ Cooper, W. E., y Greenberg N. (1992). Reptilian coloration and behavior. *In* C. Gans and D. Crews (eds.). *Biology of the Reptilia*. Vol. 18. Physiology E. Hormones, Brain, and Behavior. (298–422). Chicago: The University of Chicago Press.
- ✓ Cooper, T. G. (1998). Epididymis. *In*: Knobil, E. y Neill, J. D. (eds). *Encyclopedia of reproduction*, Vol 2. (1-17). San Diego, California, EUA: Academic Press.
- ✓ Cooper T.G., (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology*, 9(4):533-539.
- ✓ Courty, Y. y Dufaure, J.P. (1982) Circannual testosterone, dihydrotestosterone and androstenediols in plasma and testis of *Lacerta vivipara*, a seasonally breeding viviparous lizard. *Steroids*, 39(5), 517-529.
- ✓ Cox, R. M., Skelly, S. L., Leo, A. y John-Alder, H. B. (2005). Testosterone regulates sexually dimorphic coloration in the eastern fence lizard, *Sceloporus undulates*. *Copeia*, (3), 597-608.
- ✓ Dacheux J.L., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Ecroyd, H., Druart, X., Gatti, J.L., Dacheux, F. (2012). The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(4):197-210.
- ✓ Damjanov, I. (1987). Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Laboratory Investigation*, 57, 5-20
- ✓ Davis, W. B. y Dixon, R. J. (1961). Reptiles (exclusive of snakes) the Chilpancingo, región, México. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 74, 37-56.
- ✓ De Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. y Wreford N. (1998). Spermatogenesis. *Human reproduction*, 13 (1), 1-8.

- ✓ Depeiges, A. y Dacheux, J. L. (1985). Acquisition of sperm motility and its maintenance during storage in the lizard, *Lacerta vivipara*. *Journals of Reproduction y Fertility*, 74(1), 23-27.
- ✓ Depieges, A. y Dufaure, J.P., (1983), Binding to spermatozoa of a major soluble protein secreted by the epididymis of the lizard *Lacerta vivapara*. *Gamete Research*, 7(4), 401-406.
- ✓ Depeiges A, y Dufaure, J.P. (1981). Major proteins secreted by the epididymis of *Lacerta vivipara*. Identification by electrophoresis of soluble proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 667 (2), 260-266.
- ✓ Depeiges, A., Betail, G., Dufaure, J.P., (1981). Caractérrisation immunochimique d'une protéine majeure sécrétée par l' épидидyme de lezard. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 292, 211-16.
- ✓ Desantis, S., Labate, M., Labate, G. M., y Cirillo, F. (2002). Evidence of regional differences in the lectin histochemistry along the ductus epididymis of the lizard, *Podarcis sicula* Raf. *The Histochemical Journal* 34(3-4), 123–130.
- ✓ Diekman, A.B. (2003). Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(2), 298–308.
- ✓ Divya, V., V. Girish, S. Nandi, y Ramchandra, S. (2014). Dynamics of Spermatogenesis. *Annual Research and Review in Biology*, 4(1), 38-50.
- ✓ Dufaure, J.P., Courty, Y., Depeiges, A., Mesure, M. y Chevalier, M. (1986). Evolution and Testosterone Content of the Epididymis During the Annual Cycle of the Lizard *Lacerta vivipara*. *Biology of Reproduction*, 35(3), 667-675.
- ✓ Ecroyd, H., Asquith, K.L., Jones, R.C. y Aitken, R.J. (2004). The development of signal transduction pathways during epididymal maturation is calcium dependent. *Developmental Biology*, 268(1), 53-63.
- ✓ Eddy, E., Vermon, R., Muller, C.A., Hahnel, AC. y Fenderson, B.A. (1985). Inmunodissection of sperm surface modification during epididymal maturation. *American Journal of Anatomy*, 174: 225-237.

- ✓ Eddy, E. M. (2006). The Spermatozoon. In: Knobil y Neill's. (eds.) Physiology of Reproduction No. 1. (3-54). USA. Academic Press.
- ✓ Esponda, P. (1991). Spermatozoon maturation in vertebrates with internal fertilization. *Microscopy Electronic Biology Celular*, 15(1):1-23.
- ✓ Esponda, P. y Bedford, J.M. (1985), Surface of the rooster spermatozoon changes in passing through the Wolfian duct, *Journal of Experimental Zoology*, 234(3), 441-449.
- ✓ Esponda, P. y Bedford, J.M., (1987). Post-testicular change in the reptile sperm surface with particular reference to the snake, *Natrix fasciata*. *Journal of Experimental Zoology*, 241(1) 123-132.
- ✓ Fàbrega, A., Puigmulé, M., Yeste, M., Casas, I., Bonet, S. y Pinart, E.
- ✓ (2011). Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology* 76(7), 1356-1366
- ✓ Fabrega, A., Puigmule, M., Bonet, S. y Pinart, E. (2012). Epididymal maturation and ejaculation are key events for further in vitro capacitation of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 78(4), 867-877.
- ✓ Fierro, R., Foliguet, B., Grignon, G., Daniel, M., Bene, M. C., Faure, G. C., y Barbarino-Monnier, P. (1996). Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Archives of Andrology*, 36(3), 187-196.
- ✓ Fitch, H.S. (1978). Sexual size differences in the genus *Sceloporus*. *The University of Kansas Science Bulletin*, 51, 441–461.
- ✓ Flesch, F. M., W. F. Voorhout, B. Colenbrander, L. M. van Golde, and B. M. Gadella. 1998. Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biology of Reproduction* 59: 1530-1539.
- ✓ Flesch, F.M., Colenbrander, B., Van Golde, L.M., y Gadella, B.M. (1999). Capacitation Induces Tyrosine Phosphorylation of Proteins in the Boar Sperm Plasma Membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(3), 787–792.

- ✓ Flesch, F.M. y Gadella, B.M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469(3), 197–235.
- ✓ Flores-Villela, O. y Muñoz-Alonso. (1993). Anfibios y Reptiles. En: Luna, V. I. y J. B. Llorente. (Eds.). *Historia Natural del Parque Ecológico Estatal Omiltemi, Chilpancingo, Guerrero, México*. (411-442). México D. F: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). U.N.A.M.
- ✓ Flores-Villela, O. y García-Vázquez, U.O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 467-475.
- ✓ Foldesy, R.G. y Bedford, J.M. (1982). Biology of the scrotum I. Temperature and androgen as determinants of the sperm storage capacity of the rat cauda epididymidis. *Biology of Reproduction*, 26(4), 673–682.
- ✓ Fouchécourt, S., Métayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F. y Dacheux, J.L. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction* 62(6), 1790-1803.
- ✓ Galán, P. (1997). Reproductive ecology of the lacertid lizard *Podarcis bocagei*. *Ecography*, 20(2), 197–209.
- ✓ Gavaud, J. (1991). Role of cryophase temperature and thermophase duration in thermoperiodic regulation of testicular cycle in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Experimental Zoology*, 260(2), 239–246.
- ✓ Gigon-Depeiges, A. y Dufaure, J.P. (1977). Secretory activity of the lizard epididymis and its control by testosterone. *General and comparative endocrinology*. 33(4), 473-479.
- ✓ Grangeasse, C., Cozzone, A. J., Deutscher, J., y Mijakovic, I. (2007). Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends in biochemical sciences*, 32(2), 86-94.
- ✓ Guerrero, S. M., Calderón, M. L., De Pérez, G. R., y Pinilla, M. P. R. (2004). Morphology of the male reproductive duct system of *Caiman crocodilus* (Crocodylia, Alligatoridae). *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 186(3), 235-245.

- ✓ Haider, S., y Rai, U. (1987). Epididymis of the Indian wall lizard (*Hemidactylus flaviviridis*) during the sexual cycle and in response to mammalian pituitary gonadotropins and testosterone. *Journal of Morphology*, 191(2), 151-160.
- ✓ Hall, J. C., y Killian, G. J. (1987). Changes in rat sperm membrane glycosidase activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. *Biology of Reproduction*, 36(3), 709-718.
- ✓ Hernández, O., y A. Rosado. (1988). Biología molecular del espermatozoide humano. *Ciencia* 39: 249-260.
- ✓ Hernández-Franyutti, A., y Uribe, M. C. (2012). Seasonal spermatogenic cycle and morphology of germ cells in the viviparous lizard *Mabuya brachypoda* (Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology*, 273(11), 1199-1213.
- ✓ Holmes, H. J., y Gist, D. H. (2004). Excurrent duct system of the male turtle *Chrysemys picta*. *Journal of Morphology*, 261(3), 312-322.
- ✓ Holt, W. V. (1980). Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: deposition during epididymal transit and stability during washing. *Biology of Reproduction*, 23(4), 847-857.
- ✓ Horváthová, T., Cooney, C. R., Fitze, P. S., Oksanen, T. A., Jelić, D., Ghira, I. y Jandzik, D. (2013). Length of activity season drives geographic variation in body size of a widely distributed lizard. *Ecology and Evolution*, 3(8), 2424-2442.
- ✓ Huang, Y., Chung, Y. W., y Wong, P. Y. D. (1999). Potassium channel activity recorded from the apical membrane of freshly isolated epithelial cells in rat caudal epididymis. *Biology of Reproduction*, 60(6), 1509-1514.
- ✓ Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J. A., García, A., Betancourt, M., y Fierro, R. (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59(5), 1171-1180.
- ✓ Jones, R. C. (1998) Evolution of the vertebrate epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53,163-181

- ✓ Jones, R. C. (2002). Evolution of the vertebrate epididymis. In Robaire, B. y Hinton, B. T. (Eds), *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice* (pp. 11-33). New York: Springer US.
- ✓ Köhler, G. y P. Heimes. 2002. *Stachelleguane; Lebensweise, Pflege, Zucht*. Offenbach: Herpeton. Germany. 175 pp
- ✓ Kopečný, V., y Flechon, J. E. (1981). Fate of acrosomal glycoproteins during the acrosomal reaction and fertilization: a light and electron microscope autoradiographic study. *Biology of Reproduction*, 24(1), 201-216.
- ✓ Kumar, G. P., Laloraya, M., Agrawal, P., y Laloraya, M. M. (1990). The involvement of surface sugars of mammalian spermatozoa in epididymal maturation and in vitro sperm-zona recognition. *Andrología*, 22(2), 184-194.
- ✓ Leclerc, P., de Lamirande, E., y Gagnon, C. (1996). Cyclic adenosine 3', 5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of Reproduction*, 55(3), 684-692.
- ✓ Légaré, 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(2), 720-727.
- ✓ Lemos-Espinal, J. A., Smith, G. R., y Ballinger, R. E. (2001). Sexual dimorphism and body temperatures of *Sceloporus siniferus* from Guerrero, México. *Western North American Naturalist*, 61(4), 498-500.
- ✓ Lemos-Espinal, J. A., Smith, G. R., y Ballinger, R. E. (1996). Ventral blue coloration and sexual maturation in male *Sceloporus gadoviae* lizards. *Journal of Herpetology*, 30(4), 546-548.
- ✓ León-Galván, M. A., Fonseca, T., López-Wilchis, 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(1), 7-12.

- ✓ Lewis, B., y Aitken, R. J. (2001). Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 64(5), 1545-1556.
- ✓ Lin, M., Lee, Y. H., Xu, W., Baker, M. A., y Aitken, R. J. (2006). Ontogeny of tyrosine phosphorylation-signaling pathways during spermatogenesis and epididymal maturation in the mouse. *Biology of Reproduction*, 75(4), 588-597.
- ✓ Lozano, M. E. A. (2013). Estudio comparado de la reproducción y cambios histológicos de las gónadas de la lagartija vivípara *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) durante un ciclo anual en dos ambientes contrastantes. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- ✓ Maldonado Ramírez, J. (2011). Biología reproductiva del lacertilio *Sceloporus siniferus* (Reptilia: Phrynosomatidae) en bosque tropical caducifolio. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Maneely, R. B. (1959). Epididymal structure and function: a historical and critical review. *Acta Zoologica*, 40(1), 1–21.
- ✓ McKinney, R. B., y Marion, K. R. (1985). Reproductive and fat body cycles in the male lizard, *Sceloporus undulatus*, from Alabama, with comparisons of geographic variation. *Journal of Herpetology*, 19(2), 208-217.
- ✓ Méndez de la Cruz, F.M., Manríquez M. N.L., Arenas-Ríos E. y Ibarregüengoytia N. (2014). Male Reproductive Cycles in Lizards. In Rheubert, J.L., Siegel, D. y Trauth, S.E. (eds). *Reproductive Biology and Phylogeny of Lizards and Tuatara*. (p. 302-339). Florida: CRC Press.
- ✓ Millete C. 1999. Spermatozoa. In Knobil, E. y Neill, D.J. (Ed), *Encyclopedia of Reproduction*, volumen 2. (p. 587-596). San Diego, California, EUA: Academic Press.
- ✓ Morris, S. A., Howarth, B., Crim, J. W., De Cordoba, S. R., Esponda, P., y Bedford, J. M. (1987). Specificity of sperm-binding Wolffian duct proteins in the rooster and their persistence on spermatozoa in the female host glands. *Journal of Experimental Zoology*, 242(2), 189-198.

- ✓ Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B. P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M. y Vicini, E. (2013). Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. *Biology of Reproduction*, 89(3):60, 1-10.
- ✓ Navaneetham, D., Sivashanmugam, P., y Rajalakshmi, M. (1996). Changes in binding of lectins to epididymal, ejaculated, and capacitated spermatozoa of the rhesus monkey. *The Anatomical Record*, 245(3), 500-508.
- ✓ Naz, R. K., y Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 75.
- ✓ Nirmal, B. K., y Rai, U. (1997). Epididymal influence on acquisition of sperm motility in the gekkonid lizard *Hemidactylus flaviviridis*. *Archives of Andrology*, 39(2), 105-110.
- ✓ Nixon, B., Ecroyd, H. W., Dacheux, J. L., y Jones, R. C. (2011). Monotremes provide a key to understanding the evolutionary significance of epididymal sperm maturation. *Journal of Andrology*, 32(6), 665-671.
- ✓ O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., y McLachlan, R. I. (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. In Knobil y Neill's (Eds.), *Physiology of Reproduction*, (p. 1017-1070)
- ✓ Olds-Clarke, P. (2003). Unresolved issues in mammalian fertilization. *International Review of Cytology*, 232, 129-184.
- ✓ Parks, J. E., y Hammerstedt, R. H. (1985). Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biology of Reproduction*, 32(3), 653-668.
- ✓ Peláez, J., y Long, J. A. (2007). Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: I. Identification and distribution of carbohydrate residues using flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Journal of Andrology*, 28(2), 342-352.
- ✓ Pianka, E. R., y Vitt, L. J. (2003). *Lizards: windows to the evolution of diversity* (Vol. 5). University of California Press, 333 pp.
- ✓ Pincus, D., Letunic, I., Bork, P., y Lim, W. A. (2008). Evolution of the phospho-tyrosine signaling machinery in premetazoan

- lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28), 9680-9684.
- ✓ Ramírez-Bautista, A., Luría-Manzano, R., Cruz-Elizalde, R., Pavón, N. P., y David Wilson, L. (2015). Variation in reproduction and sexual dimorphism in the long-tailed spiny lizard, *Sceloporus siniferus*, from the southern Pacific coast of México. *Salamandra*, 51(2), 73-82.
 - ✓ Ravet, V., Depeiges, A., Morel, F., y Dufaure, J.P. (1991). Synthesis and post-translational modifications of an epididymal androgen dependent protein family. *General and Comparative Endocrinology*, 84(1), 104-114.
 - ✓ Ravet, V., Courty, Y., Depeiges, A., y Dufaure, J.P. (1987). Changes in epididymal protein synthesis during the sexual cycle of the lizard, *Lacerta vivipara*. *Biology of Reproduction*, 37(4), 901-907.
 - ✓ Robaire, B., Hinton, B. T., y Orgebin-Crist, M. C. (2006). The epididymis. In *Knobil y Neill's (eds.) Physiology of Reproduction* (1071-1148).
 - ✓ Robaire, B., y Viger, R. S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction*, 52(2), 226-236.
 - ✓ Rodríguez-Romero, F., y Mendez, F. R. (2004). Reproductive Arrest in *Sceloporus mucronatus* (Lacertilia: Phrynosomatidae) Correlated with" El Niño Southern Oscillation. *Herpetological Review*, 35(2), 121-122.
 - ✓ Rodríguez-Tobón, A., Fierro, R., León-Galván, M. A., Rosado, A., Cortés-Barberena, E., y Arenas-Ríos, E. (2015). Tyrosine phosphorylation as evidence of epididymal cauda participation in the sperm maturation process of *Corynorhinus mexicanus* bat. *Acta Zoologica*, 97, 310–318.
 - ✓ Rodríguez-Tobón, A. (2016). Estudio de la maduración de espermatozoides epididimarios del murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México. p 72
 - ✓ Roy, S. C., y Atreja, S. K. (2008). Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 107(1-2), 68-84.

- ✓ Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E. V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., y Visconti, P. E. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 65, 245-259.
- ✓ Schröter, S., Osterhoff, C., McArdle, W., y Ivell, R. (1999). The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction Update*, 5(4), 302-313.
- ✓ Setchell, B., y Breed, W. (2006). Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. In: Knobil y Neill's (eds.) *Physiology of Reproduction* No. 1. (p 587-596). USA: Academic Press.
- ✓ Setchell, B. P. (1998). The parkes lecture heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114(2), 179-194.
- ✓ Sidhu, K. S., Mate, K. E., Gunasekera, T., Veal, D., Hetherington, L., Baker, M. A. y Rodger, J. C. (2004). A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Society for Reproduction and Fertility*, 127(1), 95-103.
- ✓ Simón-Salvador, P. R., Trillo, A. Á., y Fuentes-Mascorro, G. (2016). Choque hipoosmótico en espermatozoides de víbora de cascabel. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3), 52-57
- ✓ Sinervo, B., Mendez-De-La-Cruz, F., Miles, D. B., Heulin, B., Bastiaans, E., Villagrán-Santa Cruz, M., ... y Gadsden, H. (2010). Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science*, 328(5980), 894-899.
- ✓ Smith, H. M., y Taylor, E. H. (1950). *An annotated checklist and key to the reptiles of Mexico exclusive of the snakes*. *Bulletin of the U.S. National Museum*, 199, 1-253.
- ✓ Sokal, R. R., y Rohlf, F. J. (1995). *Biometry*. NY: WH Freeman y Co.
- ✓ Steinberger, E. (1971). Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiological Reviews*, 51(1), 1-22.
- ✓ 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(4), 483-491.

- ✓ Takano, H., Abe, K., y Ito, T. (1981). Changes in the mouse epididymis after ligation of the ductuli efferentes or proximal epididymal duct: qualitative and quantitative histological studies [author's translation]. *Kaibogaku Zasshi* 56(2), 79–90.
- ✓ Takashi. W.I., Mahbub Hasan, A. K. M., y Sato, K. I. (2012). Protein-tyrosine kinase signaling in the biological functions associated with sperm. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 1-18.
- ✓ Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S., y Bailey, J. L. (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of Reproduction*, 65(3), 784-792.
- ✓ Tash, J.S., y Bracho, G.E. (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *Journal of Andrology*, 15(6), 505-509.
- ✓ Thomas, S. M., y Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 513-609.
- ✓ Toyonaga, M., Morita, M., Hori, T., y Tsutsui, T. (2011). Distribution of glycoproteins on feline testicular sperm, epididymal sperm and ejaculated sperm. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(6), 827-829.
- ✓ Tulsiani, D. R. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1), 58-65.
- ✓ Tulsiani, D. R., Skudlarek, M. D., Holland, M. K., y Orgebin-Crist, M. C. (1993). Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biology of Reproduction*, 48(2), 417-428.
- ✓ Turner, T. T., Bomgardner, D., Jacobs, J. P., y Nguyen, Q. A. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*, 125(6), 871-878.
- ✓ Turner, T. T., Gleavy, J. L., y Harris, J. M. (1990). Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *Journal of Andrology*, 11(5), 422–428.

- ✓ Urner, F., y Sakkas, D. (2003). Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 125(1), 17-26.
- ✓ Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), 97-130.
- ✓ Vázquez, J. M., Martínez, E., Pastor, L. M., Roca, J., Matas, C., y Calvo, A. (1996). Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochemica*, 98(1), 93-100.
- ✓ Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., y Aitken, R. J. (2001). Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 65(4), 1102-1113.
- ✓ Vijayaraghavan, S., Mohan, J., Gray, H., Khatra, B., y Carr, D. W. (2000). A role for phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α in bovine sperm motility regulation. *Biology of Reproduction*, 62(6), 1647-1654.
- ✓ Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., y Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129-1137.
- ✓ Von Lanz, T., y Neuhauser, G. (1964). Morphometrische Analyse des menschlichen Nebenhodens. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 124(2), 126–152.
- ✓ Wang, Y., Ji, W., Zhao, N., Yu, N., y Liu, N. (2011). Geographic variation in clutch and egg size for the lizard *Phrynocephalus przewalskii* (Squamata: Agamidae). *Asian Herpetological Research*, 2(2), 97–112.
- ✓ Wassler Michael (2013). β 1,4-Galactosyltransferases, Potential Modifiers of Stem Cell Pluripotency and Differentiation. *Pluripotent Stem Cells*, 345.372
- ✓ Weinbauer, G. F., y Nieschlag, E. (1993). Hormonal control of spermatogenesis. In: Kretser, D.M. (Ed.) *Molecular biology of the male reproductive system* (99-142). San Diego: Academic Press.
- ✓ White, D. R., y Aitken, R. J. (1989). Influence of epididymal maturation on cyclic AMP levels in hamster spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 12(1), 29-43.

- ✓ Whiting, M. J., Nagy, K. A., y Bateman, P. W. (2003). Evolution and maintenance of social status-signaling badges. In Fox, SF, McCoy, JK y Baird, TA. (eds). Lizard social behaviour (47-82). Baltimore, MD: The John Hopkins University Press,
- ✓ World-Health-Organization. (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. World Health Organization.
- ✓ Wong, P. Y. D., Lee, W. M., y Tsang, A. Y. F. (1981). The effects of extracellular sodium on acid release and motility initiation in rat caudal epididymal spermatozoa in vitro. *Experimental Cell Research*, 131(1), 97-104.
- ✓ Yeung, C. H., Weinbauer, G. F., y Cooper, T. G. (1999). Responses of monkey epididymal sperm of different maturational status to second messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. *Molecular Reproduction and Development*, 54(2), 194-202.