



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

CBS

**PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LA LIPOPEROXIDACION EN LA
SECRECION GENITAL FEMENINA DEL MURCIELAGO
CORYNORHINUS MEXICANUS.**



**COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL**

P R E S E N T A :

Biol. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

TESIS DIRIGIDA POR:

Ricardo López Wilchis
Dr. RICARDO LOPEZ WILCHIS

Dr. ADOLFO ROSADO GARCIA

MEXICO, D.F.

1997

Agradecimientos

En éste documento se encuentran vertidos mi esfuerzo y dedicación, los cuales fueron guiados con la experiencia y los conocimientos de dos distinguidos investigadores; el Dr. Ricardo López Wilchis y el Dr. Adolfo Rosado García, a ellos ofrezco mis más sinceros agradecimientos, respeto y admiración profunda.

En todo momento, tuve la fortuna de contar con el apoyo tanto técnico, como teórico y práctico de varios investigadores de la Universidad; lo que me permitió escalar un peldaño más de mi carrera. Me refiero precisamente a los Doctores Efraín Mercado Pichardo y Héctor Serrano, al Maestro Carlos Romero y en particular a la Maestra Teresa Fonseca Favela. A todos ellos ofrezco mis agradecimientos y un reconocimiento a su labor tangible en la formación de nuevos investigadores.

Debo agradecer también a la Maestra Carolina Mudespacher Ziehl y al Dr. Omar Hernández Pérez por sus comentarios y sugerencias realizadas en torno a este trabajo, los cuales sirvieron para enriquecerlo.

Al Sr. Ignacio Hernández Cortéz, por su apoyo y por lo que representa como imagen de superación. A la familia Armas, del pueblo de Tecomalucan Tlaxcala, por las facilidades otorgadas en la realización del trabajo de campo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo económico a través de la Beca de excelencia No. 91708.

Parte de lo que perdura para siempre son los conocimientos bien adquiridos, parte de lo fundamental para mantenerse en una elite de investigadores es la amistad; estas palabras reflejan la amistad que surgió y me brindaron, las personas mencionadas; hechos que considero son perdurables por siempre.

Esta tesis esta dedicada a mi esposa Antonieta Elizabeth y a mis padres, los señores Jesús León y María de la Luz Galván.

INDICE

I- INTRODUCCION	1.
1. Substancias reactivas derivadas del oxígeno.	1.
2. El proceso de la lipoperoxidación.	3.
3. Defensas de los organismos ante las substancias reactivas derivadas del oxígeno y la lipoperoxidación.	5.
4. Almacenamiento prolongado de espermatozoides.	6.
II- JUSTIFICACION.	20.
III- EI <i>CORYNORHINUS MEXICANUS</i> , ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO.	22.
I V- DESCRIPCION DEL HABITAT DEL <i>C. MEXICANUS</i> (AREA DE ESTUDIO).	23.
V- HIPOTESIS.	26.
VI- OBJETIVOS.	26.
VII- MATERIAL Y METODOS.	27.
1. Trabajo de campo.	27.
2. Trabajo de laboratorio.	30.
3. Análisis estadístico.	34.

VIII- RESULTADOS.	34.
1. Curva estándar del MDA.	34.
2. Lipoperoxidación de los espermatozoides epididimarios del <i>C. mexicanus</i> .	36.
3. Efecto del fluido genital femenino sobre la lipoperoxidación en los espermatozoides epididimarios del <i>C. mexicanus</i> .	36.
4. Efecto del fluido genital femenino del <i>C. mexicanus</i> , sobre la lipoperoxidación en espermatozoides eyaculados de cerdo.	38.
IX- DISCUSION.	41.
X- CONCLUSION.	48.
XI- BIBLIOGRAFIA.	50.

INTRODUCCION

1. Substancias reactivas derivadas del oxígeno

El oxígeno molecular, uno de los componentes más abundantes de la atmósfera tiene una importante participación en procesos vitales para los organismos aeróbicos; por ejemplo, funciona como el oxidante terminal de la cadena transportadora de electrones que se lleva a cabo en la membrana interna de las mitocondrias, a su vez formando parte del mecanismo de respiración.

Por otra parte, el oxígeno puede resultar tóxico para todos los tipos celulares ya que se ha comprobado que produce un estrés "oxidativo". Esto se debe a que en su estado fundamental (triplete), el gas presenta dos electrones desapareados en sus orbitales moleculares y cuando es reducido, se forman una serie de intermediarios conocidos en conjunto como sustancias reactivas derivadas del oxígeno (SRO). Así, cuando acepta un solo electrón, el oxígeno se transforma en un radical libre, el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ (figura 1) (Gagnon *et al*, 1991), el cual mediante una reacción de dismutación ya sea espontánea (en solución acuosa a pH neutro) ó catalizada por la enzima superóxido dismutasa SOD (Cadenas, 1989), genera al peróxido de hidrógeno H_2O_2 (figura 1), una molécula aun más peligrosa, que puede difundir a través de las membranas ya que no presenta carga eléctrica (Fridovich, 1978) ó interactuar con el propio anión superóxido, formando entonces, al radical hidroxilo HO^{\cdot} (figura 1), mediante la reacción de Haber y Weiss (Gagnon *et al*, 1991; Grireau *et al*, 1995). Esta ultima reacción es catalizada por iones metálicos como el hierro (II) ó el cobre (I) en la reacción de Fenton (Yu, 1994). El anión superóxido cuando es protonado, genera al radical hidroperoxilo HOO^{\cdot} (figura 1) (Cadenas, 1989). El oxígeno además, puede ser excitado y movilizar uno de sus electrones desapareados, dando origen al oxígeno singulete, otro oxidante mayor generado particularmente por peroxidasas y en el sistema respiratorio mitocondrial (Naqui *et al*, 1986).

Dichas SRO tienen una configuración electrónica inestable por lo que reaccionan con diversos componentes celulares como son: proteínas (Tappel & Zalkin, 1959); carbohidratos; componentes genómicos, como las bases del DNA nuclear y mitocondrial (Cadenas, 1989; Yu, 1994) y con los lípidos (Mann *et al*, 1980; Aitken, 1991) alterándolos de manera profunda.

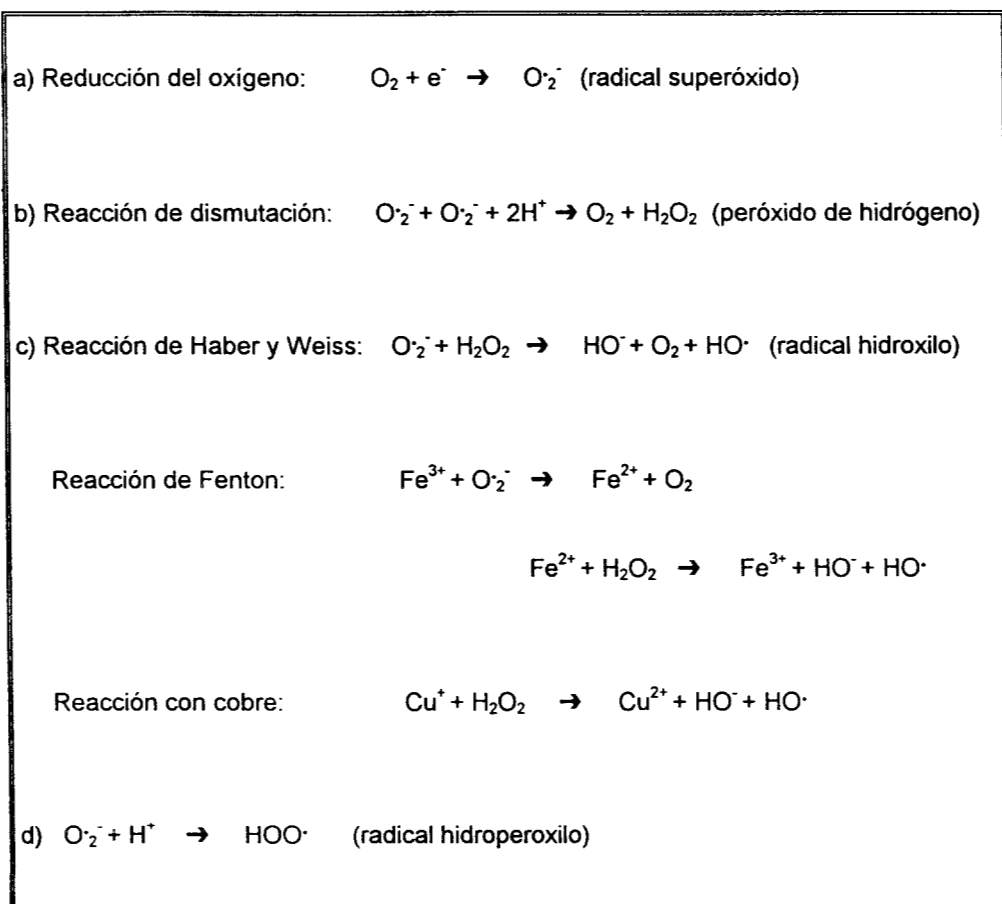


Figura 1. Principales reacciones de formación de sustancias reactivas de oxígeno.

2. El proceso de la lipoperoxidación

Los lípidos en particular, son uno de los componentes mayores en las membranas celulares y en los espermatozoides, una alta proporción de ellos, son fosfolípidos en forma de plasmalógenos que contienen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, destacando los ácidos araquidónico, docosapentanoico y docosahexanoico (Mann, 1964; Jones & Mann, 1976; Mann & Lutwak-Mann, 1981); susceptibles al deterioro oxidativo debido a su alto número de dobles enlaces en el proceso denominado "Lipoperoxidación" (Halliwell & Gutteridge, 1989; Miura *et al*, 1996); proceso definido por las fases siguientes:

- a) Iniciación, donde se da la remoción de un átomo de hidrógeno de grupos metileno por una SRO, dejando al lípido como un radical peróxido;
- b) Propagación, interacción del oxígeno molecular con esos peróxidos lipídicos convirtiéndolos en hidroperóxidos. En ésta fase es importante la participación de catalizadores metálicos, resultando en la formación de radicales alcoxilo ó peroxilo, capaces de generar nuevas reacciones con los ácidos grasos insaturados adyacentes (Yu, 1994) y
- c) Fase terminal, que es la degradación de los fosfolípidos, liberándose aldehídos citotóxicos como el 4-hidroxinonenal (HNE) (Jones & Mann, 1977 b) y el malondialdehído (MDA) (Barber & Bernheim, 1967; Bonnes-Taourel *et al*, 1992).

Si bien la lipoperoxidación es un proceso degenerativo, los mismos productos terminales (HNE, MDA) tienen una acción espermicida sobre los espermatozoides (Mann, 1964) y su cuantificación ha sido empleada como un indicador de daño celular causado por las SRO.

La lipoperoxidación ocasiona disrupción estructural de las membranas celulares en los espermatozoides, resintiéndose el mayor efecto en la región de la cabeza; tanto en la membrana plasmática como en las del acrosoma, pero en general, se da una pérdida de la integridad membranal en todas las regiones, resultando en alteración de sus propiedades de permeabilidad y fluidez (Jones & Mann, 1976; 1977 (a, b); Lenzi *et al*, 1996), inactivación de enzimas membranales, desbalance ionico (Bell *et al*, 1993) y modificación en la actividad enzimática intracelular (Alvarez & Storey, 1984a). Tales alteraciones se ven reflejadas en la funcionalidad de los gametos masculinos disminuyendo su metabolismo (Demple, 1991), movilidad (Bell *et al*, 1993) y su capacidad para fusionarse al ovocito en la fertilización (Mann *et al*, 1980; Aitken & Clarkson, 1987; Gagnon *et al*, 1991; Selley *et al*, 1991), aglutinación y finalmente la muerte celular (Jones & Mann, 1973; Fridovich, 1978; Mann *et al*, 1980; Alvarez & Storey, 1985; Alvarez *et al*, 1987).

Se ha demostrado que la lipoperoxidación puede ocurrir espontáneamente en muestras de espermatozoides cuando son mantenidas en condiciones aeróbicas (Alvarez & Storey, 1982; 1984b). Por otra parte, Mastroianni & Jones (1965) y Maas *et al*, (1976) midieron la concentración de oxígeno en el oviducto de la coneja y mono rhesus respectivamente, reportando una pO_2 similar en ambos casos (60 Torr); lo que sustentaría un ambiente aeróbico para los espermatozoides en esa región. Por su parte, Restall, (1967) y Dukelow & Riegle (1974), considerando que esa pO_2 sería similar en el oviducto de la mujer, calcularon un tiempo de sobrevivencia entre 10 a 30 horas para los espermatozoides de humano en el tracto genital femenino; además, observaron que el tiempo disminuía a 2.5 - 25 horas cuando los espermatozoides fueron incubados a una pO_2 de 150 Torr, que es similar a la del aire seco a 0 metros de altura. Mientras que Alvarez y col en 1987, calcularon un tiempo de sobrevivencia todavía menor (1 - 10 horas) para espermatozoides de humano si fuesen incubados a una pO_2 de 60 Torr. En concordancia, esos investigadores propusieron que el deterioro debido a los intermediarios del oxígeno son uno de los procesos que limitan, fundamentalmente, la vida del espermatozoide mamífero en el oviducto, al menos en las especies que no tienen una capacidad especial de almacenamiento.

En los mamíferos, la fertilización se lleva a cabo de manera interna; los espermatozoides son inseminados en el interior del tracto genital de la hembra ya sea en la región anterior de la vagina o directamente en el útero según la especie (Hunter, 1980) y pasan un tiempo almacenados en la parte baja del istmo oviductal, donde experimentan ciertos cambios denominados en conjunto *capacitación*, volviéndose competentes para fertilizar (Yanagimachi, 1994). A pesar del sitio de deposición del semen, la vasta mayoría de espermatozoides se eliminan del tracto tarde o temprano (Drobnis & Overstreet, 1992) y solo una pequeña fracción migran exitosamente al encuentro del gameto femenino (en el *ámpula* o la *unión ampular-ístmica*), con el que se fusionan y lo activan en la fertilización, creando así una progenie cuya genética es diferente de ambos padres.

Estudios efectuados con espermatozoides obtenidos del epidídimo de algunos mamíferos indican que las fracciones mitocondrial, de retículo endoplásmico, peroxisomas y citoplasma (Alvarez & Storey, 1984a; Gireau *et al*, 1995) son importantes fuentes de SRO; por otra parte, los leucocitos polimorfonucleares liberan SRO durante su gran actividad respiratoria que acompaña la fagocitosis (Fridovich, 1978; Gagnon *et al*, 1991; Aitken *et al*, 1992). Además, el plasma seminal mediante acción enzimática y participación de iones metálicos de transición, es otra fuente de liberación de SRO (Holland & Storey, 1981; Bonnes-Taourel *et al*, 1992).

3. Defensas de los organismos ante las SRO y la lipoperoxidación

Cabe señalar que los organismos también cuentan con varios elementos de defensa con los que pueden anular y eliminar a esas SRO ya mencionadas ó bien, inhibir y contrarrestar algunos de sus efectos. A la fecha, los sistemas de defensa se han agrupado como a continuación se muestra:

Defensas primarias- involucradas en la transformación de las SRO a sustancias inocuas; principalmente las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa (Fridovich, 1978), citocromo oxidasa (Naqui *et al*, 1986) y el complejo glutatión/glutatión reductasa/glutatión peroxidasa (Mann *et al*, 1980; Alvarez & Storey,

1984a). Además, de moléculas antioxidantes como la vitamina E (Tappel & Zalkin, 1959), vitamina A (Yu, 1994), ácido ascórbico, ácido úrico y glutatión (Cadenas, 1989).

Defensas secundarias- encargadas de la remoción ó reparación de los daños provocados por las SRO, entre las que destacan: enzimas lipolíticas y proteolíticas (Cadenas, 1989; Yu, 1994).

Existen otras moléculas que participan en la modulación del proceso de peroxidación, entre ellas se encuentran proteínas quelantes de hierro y cobre (Jones & Mann, 1977 (b); Yu, 1994). También se ha demostrado la participación de hormonas esteroides principalmente, el estradiol y el 2-hidroxiestradiol (Miura *et al*, 1996) como substancias antiperoxidantes, ya que interrumpen la fase de propagación de la lipoperoxidación.

Ya que la espermatogénesis, copulación y fertilización son eventos estrechamente sincronizados en muchos mamíferos, se dice que los espermatozoides no mantienen su viabilidad por largos períodos (Crichton, *et al*, 1981) y probablemente debido a los cambios de las condiciones ambientales en el tracto reproductor femenino, su vida de fertilización es corta (Racey, 1975). Desde este punto de vista es importante recordar que, algunos murciélagos pertenecientes a las familias Vespertilionidae y Rhinolophidae presentan un fenómeno de "almacenamiento prolongado" de espermatozoides, tanto en el epidídimo, como particularmente en el tracto genital femenino (Racey, 1979).

4. Almacenamiento prolongado de espermatozoides

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

(Wimsatt, 1960), influenciando a su vez los eventos iniciados en el otoño y resultando, en importantes adaptaciones entre las que podemos mencionar: el almacenamiento prolongado de espermatozoides (Wimsatt, 1969; Racey, 1975), el postergamiento de la ovulación y de la fertilización, hasta que emergen de su letargo permanentemente ya al inicio de la primavera (Jerrett, 1979; Oxberry, 1979).

La mayoría de éstos organismos habitan en regiones templadas y son hibernantes, estado fisiológico caracterizado por un profundo torpor mantenido solo con despertares periódicos cortos durante los meses fríos del año; por lo mismo, mucha de la información existente en torno a los mecanismos involucrados en la sobrevivencia prolongada de espermatozoides en murciélagos, proviene de estudios con especies de esas regiones. Sin embargo, el fenómeno del almacenamiento también se ha reportado en otras especies subtropicales y tropicales, ya que presentan los llamados "torpor diario" o bien "torpor irregular", indistinguibles de la hibernación y diferente de ella solo por que los periodos de hipotermia fisiológica son más cortos.

El sitio de almacenamiento de espermatozoides en los murciélagos varía con la especie, pudiendo llevarse a cabo en: el útero, los oviductos ó la unión útero-tubaria (Richardson, 1979). Por otra parte, se ha especulado que el tiempo de almacenamiento de los gametos masculinos depende del rigor y duración de la estación fría de año, lo que está correlacionado con la latitud. En éste interesante fenómeno hay dos parámetros importantes que deben tomarse en cuenta; uno de ellos es precisamente el tiempo que permanecen almacenados los espermatozoides y el otro es el que mantengan sus características fundamentales (viabilidad, integridad y capacidad de realizar movimiento progresivo, así como de llevar a cabo la fertilización). En los mencionados quirópteros, se han realizado experimentos tanto in vivo como in vitro, evaluándose ambos parámetros; además, se tienen resultados de investigaciones con individuos estudiados en condiciones naturales y en laboratorio, por lo que ahora se sabe de especies que cuentan con periodos de almacenamiento espermático entre los 16 hasta los 198 días, manteniendo su capacidad de fertilización (tabla 1).

Especie	Periodo de almacenamiento en días	Sitio de almacenamiento	Fuente
Hibernantes (de zonas templadas)	—		
RHINOLOPHIDAE			
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	—	O	Racey, 1975
<i>Rhinolophus hipposideros</i>	—	O	"
VESPRTLIONIDAE			
<i>Nyctalus noctula</i>	198	U	Racey, 1973; 1975
<i>Pipistrellus abramus</i>	175	U	Hiraiwa & Uchida, 1956
<i>Eptesicus fuscus</i>	156	—	Wimsatt, 1944
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	151	U	Racey, 1973; 1975
<i>Myotis lucifugus</i>	138	UUT	Wimsatt, 1944; Racey, 1979
<i>Corynorhinus rafinesquei</i>	76-108	U	Pearson, et al., 1952
<i>Myotis sodalis</i>	68	—	Gates, 1936
Con Torpor Diario (de zonas subtropicales)			
<i>Corynorhinus mexicanus</i>	≈ 30	—	López, 1989
<i>Eptesicus furiinalis</i>	≈ 60	—	Myers, 1977
<i>Lasiurus ega</i>	≈ 60	—	"
<i>Myotis albescens</i>	≈ 60	—	"
<i>Chalinobobus gouldii</i>	33	—	Hosken et al., 1996
(de zonas tropicales)			
<i>Scotophilus heathi</i>	≈ 35	UUT	Krishna & Dominic, 1978
<i>Tylionictes pachipus</i>	21	O	Racey, 1973; 1975
<i>Pipistrellus ceylonicus</i>	16	O	Gopalakrishna & Madhavan, 1971

Oviducto (O), unión útero-tubaria (UUT), útero (U). ≈ Período aproximado de almacenamiento. —Indica que el almacenamiento puede ser en más de un órgano, ó la carencia del dato.

Tabla 1. Periodo y sitio de almacenamiento de espermatozoides en hembras de murciélagos.

Fenton en 1984, mencionó al respecto que el apareamiento entre esos murciélagos se realiza en el tiempo más propicio y que el almacenamiento de espermatozoides por parte de las hembras permite que el nacimiento de las crías sea en la temporada más favorable del año tanto en temperatura como en disponibilidad de alimento.

Si bien, ésta adaptación se conoce ya hace más de un siglo (Pagenstecher, 1859) y diversos investigadores han abordado el tema en un esfuerzo por clarificar como es que los espermatozoides almacenados permanecen viables y mantienen su capacidad fertilizante por tanto tiempo, todavía a la fecha, no hay un trabajo que explique este comportamiento celular de manera contundente.

Entre los reportes publicados, se cuenta con los trabajos realizados por Fawcett & Ito (1965) y Wimsatt *et al*, (1966) quienes detectaron diferencias morfológicas entre los espermatozoides pre-eyaculatorios (del epidídimo) con los inseminados (uterinos) del murciélago *Myotis lucifugus*; solamente en que los primeros presentan gota citoplásmica al nivel de la pieza media, dato que indica una lenta maduración espermática en la cauda del epidídimo, mientras que ya no es detectable en los últimos. Otra de las diferencias notables encontradas, implica una ligera reorganización del cuello, donde se puede apreciar una constricción que involucra, una estructura denominada por ellos como "enrollamiento membranoso"; la cual consiste de dos segmentos de la envoltura nuclear situados sobre cada lado del cuello, entre la base nuclear y el primer par de miembros regulares de la vaina mitocondrial y que están enrollados superfluamente. Tal estructura, describen que está bien desarrollada en los espermatozoides epididimarios del murciélago, mientras que solo unos pocos fragmentos esparcidos de material membranoso es todo lo que permanece en los espermatozoides uterinos.

Sus resultados, no demuestran diferencias organizacionales significativas entre los espermatozoides comparados, que indicaran alguna especialización para su larga estancia en el órgano almacenador; así mismo, al comparar los espermatozoides de ésta especie con los de otros mamíferos, Krutzsch y col, (1982) tampoco encuentran diferencias que ayuden a explicarlo.

En 1969, Wimsatt junto con su grupo, realizando estudios histológicos, dan evidencias de la posible existencia de un órgano especializado para almacenar espermatozoides en el tracto genital femenino, datos que se vieron apoyados por información posterior, haciendo notar que el órgano difiere del resto del tracto por:

- a) Número relativo de células presentes,
- b) La naturaleza de la asociación física hacia el epitelio; Racey (1975), puntualizó que los espermatozoides situados en la proximidad de la pared epitelial del órgano almacenador, se encuentran ordenados con sus cabezas orientadas hacia el tejido, estableciéndose contacto entre su membrana plasmática y las microvellosidades epiteliales; mientras que otros espermatozoides observados en el interior de criptas uterinas y en pliegues e indentaciones del oviducto, el contacto se generaliza a una mayor área de la membrana. Esto último, implica una acción de nutrición y protección de las células epiteliales hacia los espermatozoides. Pero, una asociación íntima de éste tipo puede interpretarse como un preludio a su destrucción como se menciona en el trabajo de Krutzsch *et al*, (1982).
- c) Presencia de características histoquímicas especiales; se ha reportado un forro de mucosubstancias ácidas en el epitelio uterino adjudicándole una posible función protectora hacia los espermatozoides (Racey, 1975).
- d) Menor incidencia de destrucción espermática por fagocitosis leucocitaria; cuando se compara la masiva invasión de leucocitos dentro del tracto reproductor femenino, lo cual ocurre después de la inseminación en algunos mamíferos (Phillips & Mahler, 1977), el tracto reproductor de los murciélagos que almacenan espermatozoides, son marcadamente libres de leucocitos. Por otra parte, después de la ovulación la remoción de la masa de semen en el útero, se lleva a cabo rápidamente, como lo reportaron Potts & Racey (1971), para el *Pipistrellus pipistrellus*.

En 1971, Hunter y col, aislaron una proteína de la vesícula seminal de *M. lucifugus* y reportaron que al adicionar una cantidad de 0.07mg a preparaciones de duodeno y útero de ratón, se inhibió marcadamente la actividad contráctil del músculo liso; además, al administrarla por vía intravenosa a conejos, disminuyó la proporción de linfocitos circulantes, mientras que la de heterófilos aumentó arriba del nivel basal por un tiempo aproximado de 5 horas después de la inyección. Desafortunadamente no se tienen evidencias de que la proteína sea secretada por la vesícula seminal. Pero, si se presentara en el plasma seminal de manera libre ó unida a los espermatozoides, la proteína podría ser transportada a través del tracto reproductor femenino y bloquearía entonces el transporte de espermatozoides, haciéndolos permanecer en el útero sin ser evacuados. Por otra parte, ya que la proteína de vesícula seminal tiene efecto sobre el número y distribución de leucocitos, podría prevenir que los espermatozoides depositados en el tracto reproductor de la hembra, sean fagocitados y permanezcan almacenados por un tiempo mayor a los 4 meses en esa especie.

Durante el tiempo en que se han efectuado estudios sobre la biología de los murciélagos, se tienen observaciones, acerca de la presencia de una estructura que ocluye en gran medida el diámetro de la vagina, funcionando como un tapón en esa región del tracto reproductor (que dependiendo de la especie, es originada a partir de las secreciones genitales del macho, de la hembra, por diferenciación celular de la vagina ó por la participación conjunta de ellas); al respecto, Racey en 1975 mencionó que se trata de uno de los mecanismos que han desarrollado algunas especies para prevenir la pérdida de los espermatozoides a través de la vagina.

Aún cuando varios factores están involucrados en la remoción de los espermatozoides inseminados en el tracto genital femenino (debido a contracciones musculares, fagocitosis por leucocitos y células epiteliales ó la entrada activa de espermatozoides dentro del tejido epitelial ó subepitelial) y por los datos reportados anteriormente, podemos darnos cuenta que estos procesos no son activos durante el periodo de almacenamiento en los murciélagos.

El trabajo realizado propiamente por Racey (1975), fue enfocado a investigar sobre el metabolismo de los espermatozoides mientras se encuentran almacenados, para lo cual

llevó a cabo estudios histoquímicos con 8 especies británicas y reportó para el epitelio uterino y los propios espermatozoides, los componentes de un aparato enzimático y una fuente de nutrientes. En particular, uno de los materiales detectados con mayor intensidad fue glucógeno presente en grupos de células epiteliales, ocasionalmente flotando libre en el útero y en la cabeza y pieza media de los espermatozoides; sin embargo, como lo reporta Mann (1964), los espermatozoides del mamífero son incapaces de glucogenolisar.

Al respecto, Racey (1975), también detectó en células del epitelio uterino, aunque solo ocasionalmente, a la enzima fosfatasa alcalina que esta relacionada con la degradación del glucógeno. Otra enzima, la glucosa-6-fosfatasa que participa en la síntesis e hidrólisis de la glucosa-6-fosfato, mostró actividad en el epitelio uterino y en la región acrosomal de los espermatozoides, con lo que sugiere, que el útero secreta metabolitos durante el periodo de almacenamiento, como fuente nutricional exógena para los espermatozoides que están en estrecha proximidad a la pared luminal. Además, Racey (op. Cit.), detectó sorbitol deshidrogenasa en la pieza media de los espermatozoides y en células epiteliales (débilmente en estas últimas); enzima relacionada con la conversión de glucosa a fructosa vía sorbitol, en este sentido y tratando de discernir entre los principales carbohidratos utilizados por los gametos masculinos para producir su energía, administró glucosa marcada (^3H) a hembras inseminadas y mantenidas en condiciones controladas en el laboratorio (de hibernación), detectándola tiempo después, solamente en la superficie de los espermatozoides; por otra parte, reporta la presencia de fructosa en el plasma uterino de esas hembras, especulando que la vía metabólica fundamental de los espermatozoides podría ser fructolítica y que de ser así, su utilización podría llevarse a cabo tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Finalmente, Racey (1975), detectó abundantes fosfolípidos en el epitelio uterino de los murciélagos analizados, considerando que esas moléculas pueden ser secretadas como tales o como ácidos grasos libres y a su vez, los ácidos grasos podrían estar disponibles para reparar los fosfolípidos de la membrana en los espermatozoides; dato muy importante considerando que durante la lipoperoxidación hay degradación de los fosfolípidos y un mecanismo de reparación activo favorecería el mantenimiento de la integridad celular.

Harrison (1977) por su parte, ha diferenciado en los espermatozoides, entre el metabolismo para proveer la energía requerida en la movilidad y la necesaria para el mantenimiento de la integridad celular, particularmente la reparación de las membranas y el mantenimiento de los niveles iónicos intracelulares durante el almacenamiento; el ATP es requerido en estos procesos, pero a niveles mucho más bajos que para la movilidad. Es entonces, que resaltan los estudios de Fawcett & Ito (1965), Fawcett (1970) y de Uchida & Mori (1972), donde se describen aspectos morfológicos de los espermatozoides pertenecientes a diferentes murciélagos, particularmente en cuanto al número y tamaño de sus mitocondrias; las especies que si almacenan espermatozoides por largo tiempo, entre ellos el *Pipistrellus abramus*, muestran un valor alto en ambos datos, lo que hace resaltar el grosor de la pieza principal de los espermatozoides, ya que es en esa región del flagelo donde se encuentra el aparato mitocondrial; mientras que en otra especie como el *Miniopterus schreibersii*, que no presenta la adaptación reproductiva mencionada, tiene registrado el menor número y tamaño de aquellos organelos (tabla 2).

Especie	No. de mitocondrias	Tamaño relativo
* <i>Pipistrellus abramus</i>	138	Grandes
* <i>Myotis lucifugus</i>	114-120	Grandes
* <i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	160	Pequeñas
** <i>Miniopterus schreibersii</i>	78	Pequeñas

*Especies hibernantes, con almacenamiento prolongado de espermatozoides. **Especies con torpor diario; no presenta almacenamiento prolongado de espermatozoides. Datos tomados de: Racey, 1979.

Tabla 2. Número y tamaño relativo de las mitocondrias en espermatozoides de murciélagos.

Es importante mencionar que las mitocondrias contienen una alta proporción de lípidos, entre los que destacan los fosfolípidos. Por ejemplo, las mitocondrias de las células hepáticas de ratón contienen alrededor del 25% de lípidos, consistiendo principalmente de ácidos grasos insaturados (Tappel & Zalkin, 1959). Por tanto Harrison (1977), resalta que es importante la existencia de fosfolípidos extra para mantener y reparar las membranas espermáticas; entonces, las mitocondrias podrían solventar este requerimiento durante el almacenamiento sostenido en los murciélagos.

Con las evidencias previas y dado que está bien establecido que los espermatozoides utilizan fructosa exógena para sus necesidades nutricionales en condiciones donde el suministro de oxígeno es bajo para mantener la utilización aeróbica de ciertos substratos endógenos (por ejemplo lípidos); Crichton y col (1981), midieron fructosa en el útero de *M. lucifugus* y *M. velifer*, a través de un ciclo anual y observaron que, previo al periodo de apareamiento la concentración del azúcar tiene un valor nulo; mientras que, una vez iniciadas las cópulas, se da un aumento significativo del carbohidrato, concordando con el periodo inicial del almacenamiento de espermatozoides y como resultado de la infusión por parte del macho en el plasma seminal; una vez que las hembras entran en torpor en el invierno, la fructosa uterina va disminuyendo gradualmente hasta llegar al valor detectado previo al apareamiento en *M. lucifugus* que es un hibernante profundo. El caso difiere en *M. velifer* un hibernante intermitente, donde la fructosa disminuyó a niveles bajos, pero permaneciendo sin desaparecer.

Mediante un experimento en el que se aislaron hembras poco después de copular y se mantuvieron en hibernación hasta ser sacrificadas, Crichton y col (1981), observaron que parte de la fructosa registrada en el tracto genital femenino es originada *in situ* y que la cantidad producida depende del tiempo transcurrido después de que los animales fueron despertados del letargo. Con esos resultados, indicaron que la fructosa puede jugar un papel importante en la sobrevivencia de los espermatozoides solamente durante la fase inicial del almacenamiento y especulan que durante su transcurso, los espermatozoides presentan poca actividad metabólica, por lo que la escasa concentración de fructosa es suficiente para cubrir las reducidas necesidades de los gametos masculinos.

Se ha sugerido que, cuando los individuos llegan a despertar de su letargo no de manera permanente, también los espermatozoides se activan promoviendo una acelerada fructogénesis por parte del útero. Sin embargo, despertares periódicos pueden ocurrir normalmente en la naturaleza y un mecanismo que sea parte integral de la estrategia reproductiva en esas especies, para acomodar las fluctuaciones metabólicas de los espermatozoides, debe ser importante para la sobrevivencia de dichas células (Crichton *et al*, 1981).

En 1982, Crichton y col, pensaron en la existencia de un mecanismo que actuara para suprimir el metabolismo de los espermatozoides almacenados por largo tiempo, reduciéndose las demandas por los substratos disponibles en el tracto genital femenino; ellos, se basaron en los trabajos previos de Chvapil (1973; 1976), donde se menciona que los iones de zinc inhiben temporalmente la movilidad; tanto de los espermatozoides como de los leucocitos neutrofilicos polimorfonucleares y consideraron, que este metal podría significar un factor a considerar, en la identificación del mecanismo que conduce la sobrevivencia de los espermatozoides por largo tiempo en los murciélagos.

Se sabe que los espermatozoides de muchos mamíferos tienen un alto contenido de zinc (Mann, 1964) el cual se encuentra formando complejos con proteínas (Calvin, 1974; 1979) y también, que el tracto genital femenino presenta altas concentraciones provenientes del plasma seminal al momento de la inseminación (Gunn & Gould, 1958). En términos generales, la importancia del zinc deriva de la relación que tiene con el mantenimiento de la estabilidad membranal, de la cromatina y de las propiedades mecánicas del flagelo en los espermatozoides (Chvapil, 1973; Kvist & Eliasson, 1978).

Se considera que una alta concentración de zinc, más allá del punto de saturación resulta tóxico, ya que hay pérdida de la movilidad y de la viabilidad en los gametos masculinos (White, 1955; Rosado *et al*, 1970; Holland *et al*, 1976) mientras que, la liberación inducida de zinc de los espermatozoides por agentes quelantes, está asociado con incremento en el consumo de oxígeno, en la permeabilidad de la membrana y en la movilidad (Saito *et al*, 1967; Eliasson, 1971; Huacuja *et al*, 1973; Delgado *et al*, 1975). Por otra parte, el papel del zinc extracelular no es claro.

Con ésta información, Crichton y col (1982), supusieron que si el zinc juega un papel en el almacenamiento prolongado de espermatozoides, debía estar presente en altas cantidades en los órganos almacenadores durante esta época, con respecto a otros meses del año y para probarlo, utilizaron a los murciélagos *M. lucifugus* y *M. velifer* en un estudio donde cuantificaron la cantidad de zinc presente en útero; además, en diferentes órganos reproductores del macho, en ambos, a través de un ciclo anual. En sus resultados, reportan que el zinc uterino mantiene niveles equitativamente constantes durante el año, pero aumenta significativamente en dos etapas; una de ellas, corresponde a la fase de pre-hibernación cuando las hembras son inseminadas y el otro cuando emergen de la hibernación, previo a la ovulación-fecundación (un lapso cercano a los 6 meses), respectivamente; argumentando, que para el primer pico, la fuente del zinc es el semen del macho; mientras que el segundo, probablemente se deba a nuevas inseminaciones que se dieran al despertar los animales de su letargo ó bien, como pudieron constatarlo por sus experimentos de suplementación con esteroides ováricos, que hay una movilización del metal a partir de depósitos corporales para concentrarlo en el útero, mediado al menos en parte, por progesterona. Con los antecedentes que tenían, los investigadores mencionan, que los altos valores registrados posiblemente son tóxicos para los espermatozoides contribuyendo a la destrucción del exceso de esperma no requerido.

Durante la etapa intermedia, es decir durante el transcurso del periodo de almacenamiento espermático, Crichton y col, (1982) detectaron valores de zinc bajos, pero todavía mayor (2 ó 3 veces) con respecto al del resto del año, así como al reportado para el mismo tejido en otras especies de mamíferos, como la rata y el conejo (Snaith *et al*, 1971; McIntosh & Lutwak-Mann, 1972, respectivamente) indicando que esos niveles serían óptimos para la sobrevivencia de los gametos masculinos al suprimir los requerimientos energéticos hasta el tiempo en que se lleva a cabo la fertilización, sin deteriorar permanentemente su función.

Otra especulación interesante que hacen, implica que durante la etapa de aletargamiento y por tanto del almacenamiento de espermatozoides, las hembras permanecen en proestro y los altos niveles de estrogenos circulantes preponderantes, son los responsables de la reducción en los niveles de zinc registrados para dicha fase.

Sus experimentos al administrar estrógenos, redujeron el zinc uterino a niveles por debajo del control soportando esta especulación.

En relación a los antecedentes utilizados por los investigadores en el trabajo mencionado, junto con los resultados obtenidos en su trabajo, Crichton *et al* (1982), plantea la hipótesis de que, el zinc unido a los espermatozoides inhibe el proceso de capacitación, favoreciendo de esta manera que permanezcan vivos durante su larga estancia en el útero de las especies con la capacidad del almacenamiento prolongado. Aunque requiere de soporte experimental, la hipótesis encuentra sustento ya que se sabe que la capacitación en otras especies de mamíferos una vez iniciada, limitan las expectativas de sobrevivencia de los espermatozoides, por ser el proceso que estimula su movilidad, aumentando la utilización de energía (Soupart, 1967) y suscitando cambios que promueven la fagocitosis (Reid, 1965).

Información relacionada con la hipótesis de Crichton y col (1982), fue generada por el grupo del Dr. Krutzsch en el mismo año (1982), con sus estudios de microscopía electrónica en secciones del útero y la unión útero-tubaria, pertenecientes a individuos de las mismas especies de murciélagos, colectados también durante la etapa de almacenamiento prolongado de espermatozoides. En sus observaciones, notaron que no hay cambios morfológicos disruptivos (pre-morbidos) en las membranas acrosomal y plasmática de los espermatozoides, que fueran comparables a lo que sucede usualmente con la reacción acrosomal y/o muerte celular (falsa reacción acrosomal) poco después del coito (por ejemplo en la coneja; Van Blerkow & Motta, 1979). Esos resultados sugieren que los espermatozoides almacenados en el útero no han experimentado reacción acrosomal y que la peculiar longevidad de esas células, puede deberse a un postergamiento en su capacitación.

Pero quizás los resultados más importantes en ese sentido, son los que reportaron Uchida y Mori en 1987; cuando probaron en hembras del murciélago *Pipistrellus abramus*, mantenidas aisladas de los machos y en aletargamiento, inmediatamente después de haber sido inseminadas de forma natural, que fueron fecundadas al término de 162–178 días y que además concluyeron la gestación con partos exitosos; mientras que, en otro grupo de hembras mantenidas bajo las mismas condiciones que las

anteriores y administrándoles gonadotrofinas, para tratar de inducir la ovulación y disminuir de esta manera el tiempo de almacenamiento espermático a 20–50 días; obtuvieron los siguientes resultados: en algunas de ellas, no ocurrió la ovulación; en otras más, si se logró la inducción, pero los óvulos degeneraron y no hubo rastro de fertilización, por lo que sugirieron que los espermatozoides no se encontraban capacitados para lograr alcanzar al gameto femenino y fecundarlo. Con esos resultados, infieren que el proceso de capacitación de los espermatozoides en el murciélago *P. abramus*, requiere de un tiempo mayor a los 50 días.

Por otra parte, los mismos Uchida y Mori (1987), citan el trabajo realizado en 1973 por Racey, como un dato contrastante con sus resultados, ya que en aquel entonces, se inseminaron artificialmente con espermatozoides epididimarios del murciélago *Nyctalus noctula*, a hembras mantenidas en condición de hibernación; específicamente en la etapa final de su aletargamiento, en marzo; reportando nacimientos dos meses después, es decir, que el tiempo transcurrido entre inseminación y fertilización fue corto y los espermatozoides sólo fueron almacenados mientras concluyó la hibernación y ocurrió la ovulación. Esos resultados sugieren que los espermatozoides son capaces de fertilizar después de periodos largos ó cortos en el útero y que los eventos fisiológicos que causan la capacitación son independientes de la duración del almacenamiento.

Para 1993, nuevamente Crichton y un selecto grupo de colaboradores, realizaron una serie de experimentos con espermatozoides de *M. velifer* bajo condiciones in vitro; la propuesta en aquella ocasión fue, que la inusual longevidad de los gametos masculinos, podría deberse a la resistencia única de su membrana plasmática, la cual debía eliminarse de forma preparativa en la superficie de los espermatozoides, antes de su interacción efectiva con el ovocito en la fertilización. Para verificarlo, realizaron una serie de experimentos, donde probaron la tolerancia de los espermatozoides del murciélago a condiciones ambientales que se conoce, perturban la membrana plasmática y compararon la viabilidad de esos espermatozoides con los del hámster, humano y conejo para saber si eran únicos en su respuesta.

El fundamento de su hipótesis, fue el conocimiento que se tiene sobre la composición lipídica de las membranas celulares, en particular que dicha composición puede variar

considerablemente entre especies; siendo el cociente colesterol-fosfolípidos, la base de las diferencias especie-específicas en la resistencia a condiciones de estrés ambientales (como el choque por frío) ó en el tiempo necesario para la capacitación, por que la remoción del colesterol de la membrana plasmática es un paso importante en este proceso.

Todas las sustancias que emplearon para probar su planteamiento (detergentes, agentes que alteran la permeabilidad ó degradan a la membrana y solventes de lípidos), alteraron de manera clara (de acuerdo a su acción) a los espermatozoides de las diferentes especies y afectaron su viabilidad sin mostrar diferencia interespecifica alguna. Por otra parte, al someterlos a varios y rápidos cambios de temperatura (0°C → 37°C), no observaron efectos de detrimento sobre la viabilidad de los espermatozoides en ninguna de las especies. Estos resultados no dieron soporte a su hipótesis.

Otro punto importante, que tampoco se ha determinado es, si el metabolismo de los espermatozoides en los murciélagos es aeróbico ó anaeróbico; es tentador pensar que las condiciones lumbales del tracto genital femenino, sean anaeróbicas durante el periodo de almacenamiento prolongado de espermatozoides, aunque sucede lo contrario en diversos mamíferos (Bishop, 1956; Nevo, 1965). A la fecha, solo se cuenta con el reporte de Redenz, (1929), quien sugirió que un gran número de espermatozoides en el útero de los murciélagos generaría un alto nivel de CO₂ y este, tendría un efecto inhibitor sobre la movilidad espermatica; mientras que el O₂, se encontraría en baja concentración, aunque lo suficiente para sustentar un metabolismo aeróbico; aspecto no sustentado experimentalmente.

Como podemos darnos cuenta, la información existente en torno al fenómeno del almacenamiento prolongado de espermatozoides en murciélagos, es muy amplia; pero no se ha reportado ningún trabajo que este relacionado al conocimiento sobre el desarrollo de mecanismos involucrados en la inhibición ó interrupción de la formación de sustancias reactivas derivadas del oxígeno en los espermatozoides almacenados ni tampoco, sobre la protección hacia los efectos dañinos ejercidos por dichas sustancias en el proceso de lipoperoxidación, particularmente en el ambiente del tracto genital femenino de los quirópteros.

JUSTIFICACION

En éste trabajo concordamos con el pensamiento de otros investigadores, quienes mencionan, que en lugar de ver las adaptaciones fisiológicas específicas y únicas de los espermatozoides del murciélago, se puede obtener un mejor entendimiento investigando la existencia de aquellos mecanismos, que aseguren la sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto genital de los mamíferos en general (Racey, 1979).

Por la información que se tiene en el campo de la andrología, sabemos que la lipoperoxidación es uno de los procesos que fundamentalmente limitan la vida de los espermatozoides, una vez que han sido depositados en el interior del tracto reproductor femenino en la cópula; además, la fertilización sólo es exitosa cuando la inseminación se lleva a cabo en estrecha sincronía con la ovulación. Por tanto, es de gran importancia el conocer y entender los aspectos básicos con respecto a los mecanismos que favorecen la sobrevivencia de espermatozoides en las especies que tienen la capacidad por parte de las hembras, de almacenarlos largo tiempo.

Afortunadamente, en México se encuentra una especie de quiróptero que realiza un torpor diario durante el invierno y que almacena los espermatozoides por un periodo aproximado de 30 días, se trata del murciélago mexicano de orejas grandes "*Corynorhinus mexicanus*". Por ésta y las siguientes razones, esta especie fue seleccionada para la realización de nuestro estudio; debido a que en la década de los ochentas y tras descubrir una población en el estado de Tlaxcala, México, el Dr. Ricardo López Wilchis, llevó a cabo una investigación en torno a la biología de la especie, información que fue el tema de su tesis doctoral presentada en 1989 y que arrojó un conocimiento profundo de su biología en campo.

Posteriormente en la época de los noventas, el Doctor López, continuó el seguimiento de la población y es entonces cuando soy invitado a participar en su proyecto realizando trabajo de campo. Una vez que me relacioné con el trabajo y discutimos algunos aspectos de la fisiología del murciélago, uno de los focos que llamaron nuestra atención, era sobre la estrategia reproductiva que han desarrollado esos organismos (La fertilización retardada). Con esta inquietud, decidimos plantear un estudio dirigido

a conocer, como es que se mantienen viables los espermatozoides almacenados por largo tiempo, en el tracto genital femenino; un punto clave para tratar de responder la interrogante, resultó de la opinión y asesoramiento brindados por el Doctor Adolfo Rosado García, haciendo resaltar aún más la importancia científica de la especie, fundamentalmente por que el tema se encontraba en el campo de los estudios con relación a la lipoperoxidación; un tema cuya importancia ya se ha resaltado en el capítulo de introducción.

Es así como dos ramas de investigación biológica de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se vieron vinculadas (la Zoología y la Bioquímica de la Reproducción).

Además, esos animales son fáciles de capturar, son dóciles lo que los hace manejables y dado a la cercanía de la población de estudio con el Distrito Federal, su obtención resulta económica. Por otra parte, en la Universidad, se encuentra un importante grupo de investigación interesados en el estudio de la lipoperoxidación, por lo que se cuenta con un buen asesoramiento, con el equipo especializado disponible para desarrollar el trabajo de laboratorio y lo que es de gran importancia, se tiene montada y probada la técnica específica para cuantificar este proceso en espermatozoides de diversos mamíferos.

EL *CORYNORHINUS MEXICANUS*, ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO

El murciélago de orejas grandes es endémico de México, su distribución abarca las partes más altas y húmedas de las principales sierras del país (Hall, 1981), (figura 2) y habita principalmente en bosques templados de pino ó pino-encino, en elevaciones que van de los 1, 460m a los 3, 200m (Handley, 1959). Es una especie pequeña, presenta un pelaje de coloración pardo oscura en el dorso y café claro o crema en la región ventral (Tumlinson, 1992).

Con base a los datos de dinámica poblacional y reproducción descritos en el trabajo del Dr. López (1989), sabemos que la población estudiada del *C. mexicanus*, esta conformada por cerca de los 1000 individuos, que presenta a lo largo de un ciclo anual, cuatro tipos diferentes de poblaciones; de ellas, la población de invierno que es la de nuestro interés, se constituye de machos y hembras que van arribando de manera paulatina al refugio principal, en donde permanecen por un tiempo de 3 meses, durante el cual, se les encuentra aislados individualmente en un área donde el intervalo de temperatura, osciló entre los 9° y los 12°C, encontrándose en estado de letargo (torpor diario).

Pueden considerarse como adultos, los machos que presentan una longitud de antebrazo con 41mm (39.7 – 43.1) y un peso de 7.9g (5 – 12); mientras que las hembras lo son cuando la longitud de su antebrazo es de 42.3mm (39.3 – 45.2) y tienen un peso de 8.9g (5.1 - 10.7). Los machos, alcanzan la madurez sexual probablemente al segundo año de vida; mientras que las hembras llegan a esta condición al primero (López, 1989; Tumlinson, 1992).

El *C. mexicanus* es una especie monoéstrica estacional, el aparato reproductor femenino presenta un útero bicorne; su periodo de apareamiento inicia entre octubre y noviembre y en la mayoría de los individuos la implantación debe darse a mediados o a fines de enero. Aunque no se conoce con precisión, se estima que el almacenamiento prolongado de espermatozoides por parte de las hembras dura aproximadamente 30 días (López, comunicación personal). Considerando la terminología dada por Carter

(1970), *C. mexicanus* presenta una "fertilización retardada", ya que dicho proceso se lleva a cabo con posterioridad a una semana después de la cópula (López, 1989).

En *C. mexicanus* la preñez coincide con la época de secas de la zona y con el periodo de bajas temperaturas, el periodo de gestación es de aproximadamente 60 días, es una especie típicamente monótoa ya que presenta una sola cría por parto, dándose el pico de nacimientos de finales de marzo a principios de abril (López, 1989).

Previo al trabajo de López (1989), en la literatura no se tienen datos de esta especie en otra región del país, para saber si existen diferencias, sobre todo en cuanto a la influencia de una época invernal más larga; sin embargo, podemos generalizar la información descrita a otras poblaciones.

DESCRIPCION DEL HABITAT DEL *CORYNORHINUS MEXICANUS* (AREA DE ESTUDIO)

La población de donde se extrajeron los ejemplares se encuentra situada en el límite Sur de la región Neártica Zoogeográfica, en la montaña denominada Cerro Huilapitzo; a 10Km al Este de Tlaxco, Tlaxcala, sobre la línea limitrofe con Puebla ($19^{\circ}37'14''$ N y $98^{\circ}02'02''$ W; 3220m) (figura 2). En términos de su distribución, podemos decir que la población de estudio se encuentra en el límite Sur de ella; excepto por los controvertidos registros para Yucatán y la Isla de Cozumel validados por Koopman (1974). En esa zona se encuentra un túnel de aproximadamente 700m de largo, con 4m de alto y 2.5m de ancho, orientado de Norte a Sur; presenta un derrumbe en la parte media que obstruye el paso de un lado a otro, formando dos túneles independientes generando en el lado Sur un "refugio principal" a donde arriban hembras y machos, desde octubre a pasar la época fría, conformando la colonia de invierno; mientras que del lado Norte, al "refugio de maternidad" en donde se llegan a encontrar hembras y machos solitarios durante el invierno, pero fundamentalmente, grupos compactos de hembras gestantes formando la colonia de maternidad a partir de enero (López, 1989).

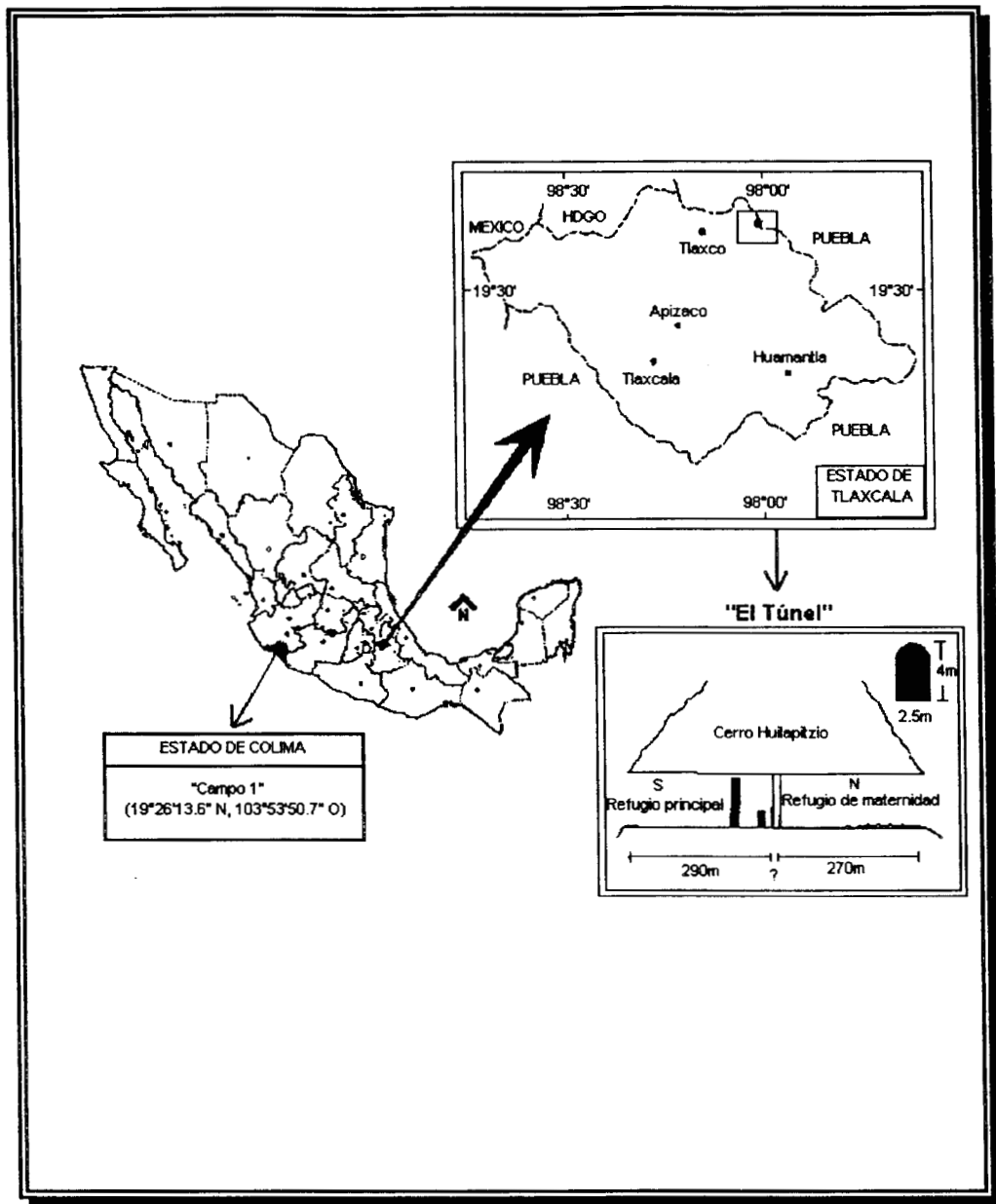


Figura 2. Ubicación de las localidades donde se colectaron los murciélagos (*Corynorhinus mexicanus*); se muestra una representación esquemática de "El Túnel" (tomado de: López, 1989).

El tipo de clima en la región es: C(w2"')bi, es decir, el más húmedo de los templados subhúmedos, con lluvias en verano y con verano fresco y largo, el tipo de vegetación es un bosque de oyamel, en donde hay una temperatura media anual del mes más caliente entre 6.5° y 22°C; con una oscilación isotermal menor a 5°C. Los datos para la marcha anual de temperatura y precipitación registrados en la zona, indican que existen dos largas estaciones, coincidiendo los meses más calurosos y húmedos para mayo - septiembre y los más fríos y secos de octubre a abril (López, 1989). La selección del túnel como un refugio por los murciélagos, se debe a que la construcción presenta un microclima caracterizado como frío, húmedo y muy estable a lo largo del año; lo que resulta benigno para los individuos con respecto a las condiciones externas, sobre todo en la época fría y seca. Las condiciones en el interior del túnel señalan una humedad relativa de 85-90% y una temperatura que se mantiene entre los 9° y los 12°C, ambos factores a lo largo del año. Cabe señalar que al fondo del refugio principal hay una grieta en el techo, por donde escurre agua, formándose un par de canales que corren pegados a las paredes; mientras que, los primeros 150m del refugio de maternidad se encuentran inundados, siendo el nivel del agua superior a los dos metros. La presencia de agua en el interior del túnel, se considera como un amortiguador de la posible oscilación en la temperatura (López, 1989).

En otro sitio del país y como resultado de un muestreo realizado por el grupo del Dr. López, entre diciembre de 1996 y enero de 1997 en el estado de Colima; particularmente en una localidad conocida como "Campo 1" y que pertenece a la sierra de Manantlán (19°26'13.6" N y 103°53'50.7" W), fueron colectados algunos ejemplares del *C. mexicanus*; y de ellos, una hembra fue empleada también dentro de la parte experimental.

Los argumentos fueron considerados para realizar el presente trabajo de investigación, con el siguiente planteamiento hipotético:

HIPOTESIS

“La secreción genital femenina de los murciélagos contiene factores que inhiben la lipoperoxidación; siendo a través de su acción que los espermatozoides almacenados por largo tiempo conservan su integridad estructural, permanecen viables y mantienen su capacidad fertilizante”.

OBJETIVOS

Para probar el postulado hipotético contamos con el siguiente objetivo específico desglosado;

I.- A través de la incubación in vitro de espermatozoides con fluido genital femenino del murciélago *Corynorhinus mexicanus*, pretendemos verificar la presencia de factores inhibidores de la lipoperoxidación, en el tracto reproductor de esas hembras durante la etapa de almacenamiento prolongado de espermatozoides.

I.1- Comprobar la presencia y actividad de peroxidación lipídica en los espermatozoides del *C. mexicanus* obtenidos de la cola del epidídimo por perfusión retrograda a través del deferente.

I.2- Determinar el efecto del fluido genital femenino del *C. mexicanus* sobre la lipoperoxidación en espermatozoides epididimarios del mismo murciélago, comparándolo con muestras en medio control después de 22 horas de incubación in vitro.

I.3- Determinar el efecto del fluido genital femenino del *C. mexicanus* sobre la lipoperoxidación en espermatozoides de cerdo, comparándolo con muestras en medio control después de 22 horas de incubación in vitro.

MATERIALES Y METODOS

1. TRABAJO DE CAMPO:

Mediante visitas mensuales de noviembre de 1996 a febrero de 1997, llevamos a cabo un muestreo y colecta de murciélagos. Las capturas se realizaron en el interior de "El Túnel", durante el día cuando los animales se encuentran en torpor, utilizando una red casa-mariposas con tubos de aluminio desmontables, costales de manta y cinta adhesiva; además, en diciembre de 1996 se colectó una hembra en la localidad de Campo 1 en Colima, México. Solo fueron seleccionados aquellos animales que presentaron características de adulto y cada uno fue sacrificado directamente en campo por dislocación cervical; procediendo a tomar sus datos morfométricos y peso. Los machos capturados tenían una longitud promedio del antebrazo = 41.06mm (39.6 – 42.0) y un peso corporal de 7.4g (7 - 7.8); mientras que la medida promedio del antebrazo en las hembras, fue de 42.73mm (41 – 44.7) y un peso de 7.88g (7.3 – 8.5).

Los animales una vez colocados sobre su dorso, se les practicó una incisión ventral desde la región terminal del esternón hasta el hueso pélvico, para de allí tener acceso al tracto reproductor. En el caso de las hembras, el canal alimentario fue desplazado, ligamos con hilo de seda al nivel de la vagina para evitar salida de líquido interno; el cuerpo uterino, los cuernos uterinos y ovarios fueron removidos (figura 3). En los machos, accedimos a los epidídimos prolongando la incisión hasta el primer tercio de la cola vertebral, se detectó y seccionó el conducto deferente, removiendo epidídimos y testículos (figura 4). La remoción de los tractos reproductores fueron hechas observando la región del individuo bajo el microscopio de disección. Finalmente, cada muestra fue almacenada de manera individual en un tubo de polipropileno, conservándolos en nitrógeno líquido (-165°C) para su transporte al laboratorio, donde fueron transferidos al interior de un ultracongelador (-70°C), permaneciendo hasta ser usados en la fase experimental.

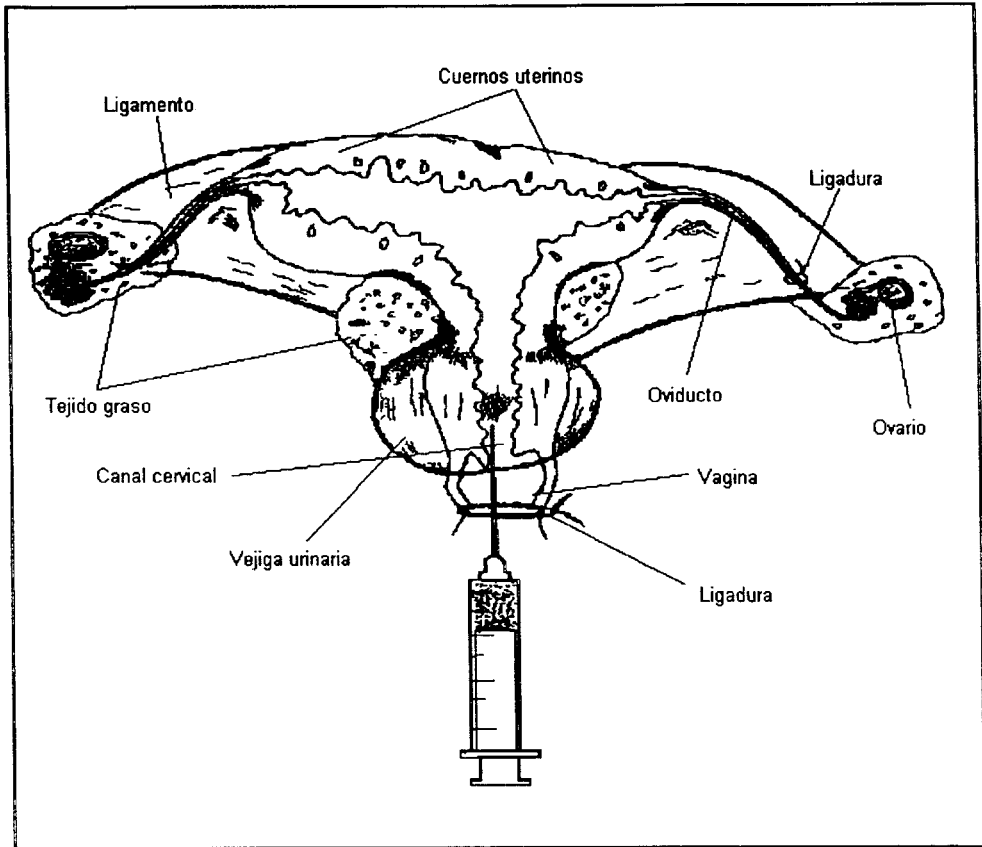


Figura 3. Diagrama del tracto reproductivo femenino de *Corynorhinus mexicanus*. Representación esquemática del procedimiento para la obtención del fluido genital, que se hace por reflujos a través de vagina.

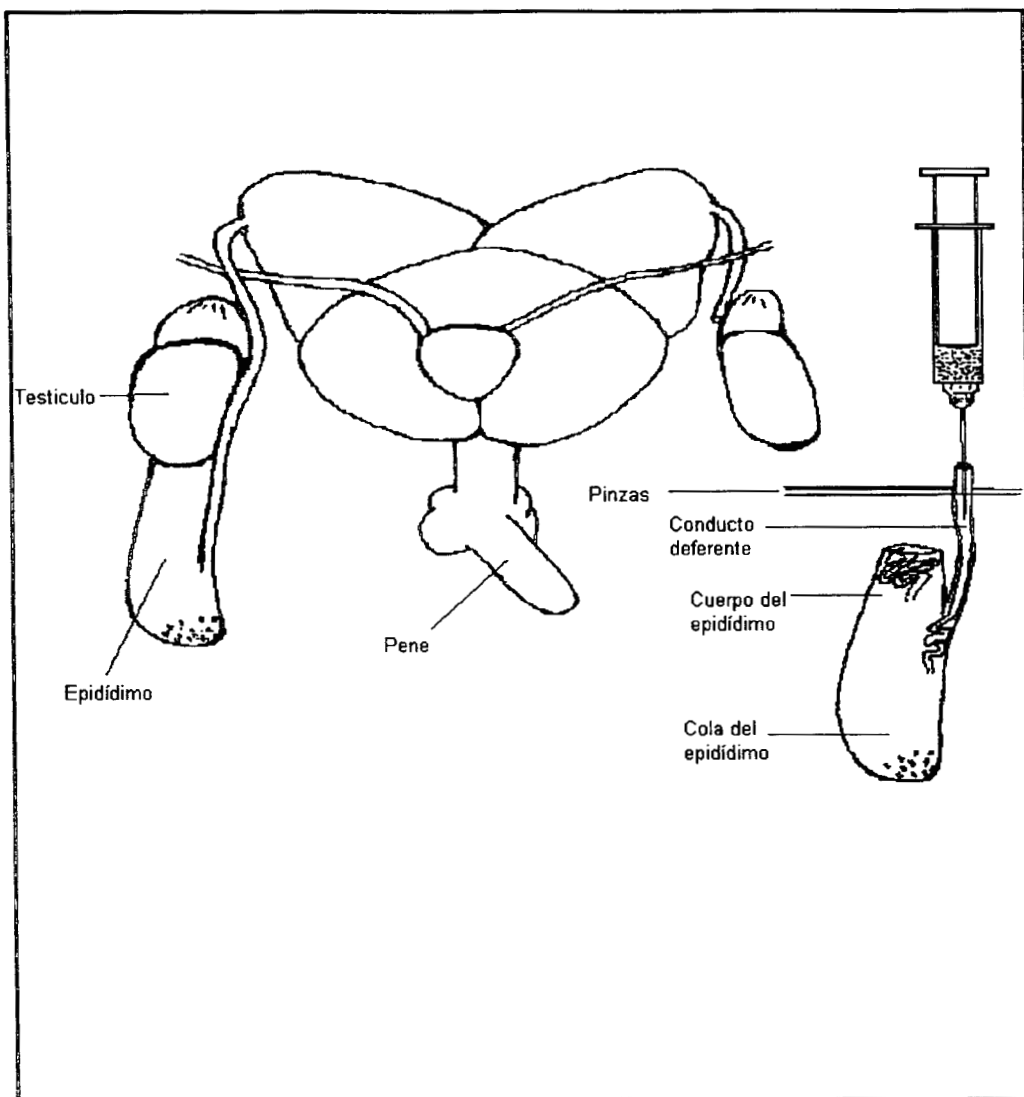


Figura 4. Diagrama del tracto reproductor masculino de *Corynorhinus mexicanus* adulto, en época de apareamiento. Representación esquemática del proceso para la obtención de espermatozoides por flujo retrogrado a través del conducto deferente.

2. TRABAJO DE LABORATORIO:

Soluciones y medios de incubación: El diluyente empleado para realizar la cuenta de espermatozoides es una solución fijadora que consiste en NaHCO_3 , 50g; formalina al 35%, 10ml y agua destilada a un volumen final de 1L. Para el lavado y suspensión de los espermatozoides, empleamos medio Ringer con la composición: NaCl , 95 mM; KCl , 5 mM; KH_2PO_4 , 1.1 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM y CaCl_2 , 1.7 mM; el pH fue ajustado con NaOH a 7.2. Para obtener el fluido genital femenino del murciélago *C. mexicanus*, así como para la incubación de los espermatozoides, se utilizó el medio BWW, que fue preparado a partir de la solución anterior sin ajustar, adicionándole dextrosa, 5.55 mM; NaHCO_3 , 25 mM; DL-ácido láctico, 30 mM y ácido pirúvico, 0.33 mM; exceptuando únicamente albúmina; el pH de este medio fue ajustado con HCl a 7.2 (Biggers *et al*, 1971).

Reactivos: El Tetrametoxipropano (malondialdehido-bis(dimetilacetal)), el ácido tiobarbitúrico, la dextrosa, el lactato y el piruvato fueron de laboratorios Sigma Co; el ácido tricloroacético y las sales inorgánicas de los laboratorios J.T. Baker.

Obtención del fluido genital femenino del *C. mexicanus*: Los tractos reproductores femeninos fueron descongelados al transferidos del interior del ultracongelador, a una caja Petri (de 2.5 cm de diámetro) permaneciendo unos instantes a la temperatura del laboratorio. Una vez descongelados se ligaron los oviductos por su parte distal con respecto al cuerno uterino y se lavaron por reflujo al hacer pasar un volumen de 800 μl de medio BWW sin albúmina frío, a través de la aguja de una jeringa del 27, introducida por la vagina. En todo momento, las observaciones fueron hechas bajo el microscopio estereoscópico a 25 aumentos. El fluido fue colectado en un tubo de polipropileno de 2ml de donde se pipeteó una alícuota de 10 μl , para verificar presencia de espermatozoides y contarlos en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). La suspensión obtenida, finalmente fue centrifugada a 410g por 5 minutos para sedimentar las células presentes. Se separó el sobrenadante, conservándolo a 4°C hasta antes de adicionarlo al medio de incubación; en cada experimento se utilizó el fluido de una

hembra, el cual fue considerado como el "fluido genital femenino" (FGF), inhibidor de la lipoperoxidación.

Obtención, preparación y lavado de los espermatozoides de murciélago; Para comprobar la presencia y cuantificar la actividad de lipoperoxidación en los espermatozoides del *C. mexicanus*; además de verificar el efecto del FGF sobre la lipoperoxidación a nivel específico, utilizamos los espermatozoides epididimarios de uno de los murciélagos previamente colectados.

Los órganos reproductores masculinos fueron descongelados de manera similar a los provenientes de hembras; posteriormente y mediante un corte en la región del cuerpo, separamos la cauda del epidídimo y extrajimos su contenido haciendo pasar 1ml de solución Ringer a cada uno de los epidídimos de un individuo, por flujo retrógrado a través del conducto deferente. De los espermatozoides en suspensión se registraron los parámetros de concentración espermática, movilidad cuantitativa y viabilidad, utilizando métodos de observación simples aceptados por el manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (WHO).

La densidad de espermatozoides fue estimada con un hemocitómetro; la suspensión se diluyó (1:100) con solución fijadora, utilizando una pipeta Coming para cuenta de eritrocitos; el contenido de la pipeta fue agitado con un aparato eléctrico y la observación fue hecha en un microscopio de contraste de fases a 400 aumentos. La movilidad espermática cuantitativa y la viabilidad se estimaron de manera conjunta después de realizar una dilución de la suspensión de espermatozoides (de acuerdo con la concentración estimada), empleando el medio Ringer (a temperatura ambiente) como diluyente, en un tubo de polipropileno de 1.5 ml. De la suspensión diluida, se pipeteó una alícuota de 5 μ l, transfiriéndola a una laminilla. Las observaciones se realizaron en el microscopio de contraste de fases al aumento antes mencionado. Se contaron al menos 100 células de diferentes campos escogidos al azar y se calcularon los porcentajes totales.

La suspensión de espermatozoides fue lavada con 8 ml de medio Ringer a temperatura ambiente, en un tubo de plástico con fondo cónico por sedimentación a 500 veces la

fuerza de gravedad, durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón celular resuspendido suavemente ajustado la suspensión final a 210×10^6 células/ml con medio BWW sin albúmina también a temperatura ambiente.

Obtención, preparación y lavado de los espermatozoides de cerdo: Para probar el efecto inhibitor del FGF sobre la lipoperoxidación en espermatozoides frescos, se emplearon muestras de eyaculados de cerdo, obtenidas mediante la técnica de “la mano enguantada”. Dichas muestras, provinieron de cuatro individuos diferentes criados en la granja porcícola “Los Virreyes” que esta ubicada cerca del kilómetro 20 de la carretera México-Texcoco.

El semen empleado, constituye la parte de la segunda fase de expulsión del cerdo durante la eyacuación, ya que es la fracción donde se encuentra la mayor cantidad de espermatozoides maduros y normales morfológicamente; además, la técnica mencionada permite la manipulación del fluido seminal en las mejores condiciones de higiene, evita la formación de espuma y permite almacenamiento prácticamente libre de aire (comunicación personal con el técnico colector). Durante su transporte al laboratorio, el semen se mantuvo entre los 37-39°C y una vez allí, se tomaron los parámetros de concentración espermática, movilidad cuantitativa y viabilidad, como se mencionó para el caso de los del murciélago; modificando la dilución para contar (1:200) y la temperatura de las soluciones (39°C), sólo fueron consideradas aquellas muestras con un número adecuado de células que nos permitiera llevar a cabo los diferentes tratamientos ($700-1000 \times 10^6$ células/ml) y parámetros de movilidad y viabilidad > 60% en ambos, concordando en uno de ellos, con el criterio de Mortimer y Taylor (1990), quienes consideran donadores fértiles a los hombres cuyo semen tiene una movilidad espermática superior al 50%.

Del semen se pipeteó la cantidad suficiente para tener 1000×10^6 células/ml; la suspensión de espermatozoides fue lavada con 8 ml de medio Ringer, en un tubo de plástico con fondo cónico por sedimentación a 500 veces la fuerza de gravedad, durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón celular resuspendido suavemente ajustado la suspensión final a 1ml con medio BWW sin albúmina.

Incubación aeróbica de los espermatozoides; las muestras espécimen de espermatozoides lavados, fueron sometidas a los siguientes tratamientos: en el caso de las provenientes del murciélago, se pipetearon tres alícuotas con una concentración de 70×10^6 células en tubos de polipropileno (40 x 9.6mm); a dos de ellas no se les adicionó FGF, mientras que a la tercera, se le adicionaron 100 μ l de este fluido. Por su parte, de los espermatozoides de cerdo, se pipetearon cinco alícuotas de 100 μ l conteniendo 100×10^6 células, en tubos de polipropileno; dos de las cuales se mantuvieron libres de FGF y a las otras tres se les adicionaron diferentes cantidades de FGF (50, 100 y 200 μ l respectivamente). En todos los casos, las muestras fueron completadas con BWW sin albúmina (c.b.p.= 0.75 ml) a temperatura ambiente para los del murciélago y a 39°C para los del cerdo.

En cada experimento, una de las muestras sin FGF se proceso inmediatamente para tener el valor de la lipoperoxidación antes de la incubación; mientras que las demás muestras fueron tapadas e incubadas por 22hrs (a 39°C las de cerdo y a temperatura ambiente las de murciélago). Durante ese tiempo, los tubos fueron agitados de forma manual en varias ocasiones para permitir un mayor contacto entre las fases líquida y gaseosa. Las muestras incubadas en ausencia de FGF se consideraron como "control".

Cuantificación de la lipoperoxidación; Para medir la lipoperoxidación espontánea de los espermatozoides antes y después de la incubación y verificar el efecto inhibitor del FGF sobre este proceso, se cuantificó la concentración de productos cromógenos (MDA-ATB) resultados de la reacción entre el malondialdehido (MDA) y el ácido tiobarbitúrico (ATB), como indicador de productos de la degradación de lípidos peroxidados; mediante la prueba del ácido tiobarbitúrico, empleada por Alvarez y Storey (1982), modificando la concentración de los reactivos, el volumen final del sistema de reacción y las temperaturas de incubación de los espermatozoides.

La incubación de los espermatozoides se terminó al colocar los tubos en hielo durante 15 min, adicionando al final 0.25 ml de ácido tricloroacético (ATC) acuoso al 35%. Esta suspensión fue agitada en vortex y centrifugada a $1750 \times g$ por 10 min. Se pipeteó un volumen de 0.75 ml del sobrenadante a un tubo de vidrio para cultivo con tapón rosca y agregamos 0.25 ml (0.75%) de ácido tiobarbitúrico en agua des-ionizada, repitiendo la

agitación. Los tubos se taparon e incubaron en un baño de agua hirviendo por 15 min; deteniendo la reacción al enfriarlos en hielo por 15 min y posteriormente puestos a temperatura ambiente por otro tiempo igual más. La concentración del producto MDA-TBA en la solución fue determinada directamente en un espectrofotómetro uv-visible (Shimadzu-1601PC) empleando la longitud de onda de 532 nm.

Previo a cada determinación, realizamos una curva de calibración con MDA estándar, obtenido por hidrólisis ácida del tetrametoxipropano (TMP) en ATC. Para realizarla, preparamos cinco puntos por duplicado de una solución con concentración ascendente de TMP (0 a 5 nmoles/ml) en agua des-ionizada y 0.25 ml de ATC al 35%, más 0.25ml de ATB al 0.75% respectivamente.

3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de una vía (datos no apareados) para comparar las medias de los valores entre los grupos control y tratados. Se aplicó un análisis de rangos múltiples para establecer las diferencias de las medias de los valores comparadas entre pares de los grupos experimentales. En ambos casos, se utilizó el método de Duncan con el paquete estadístico STATGRAPH, 5.0.

RESULTADOS

1. Curva estándar de MDA

En la figura 5 podemos ver los datos de densidad óptica para el MDA, correspondientes a las muestras de concentración conocida de TMP, que fueron manejados durante la prueba del ácido tiobarbitúrico en la curva estándar; el valor del coeficiente de correlación resultante ($r= 0.9799$), indica una buena proporcionalidad entre la concentración del TMP preparado y la formación de MDA a partir de su hidrólisis, además de una alta confiabilidad en cuanto a la extrapolación de los datos experimentales y su transformación a unidades de concentración.

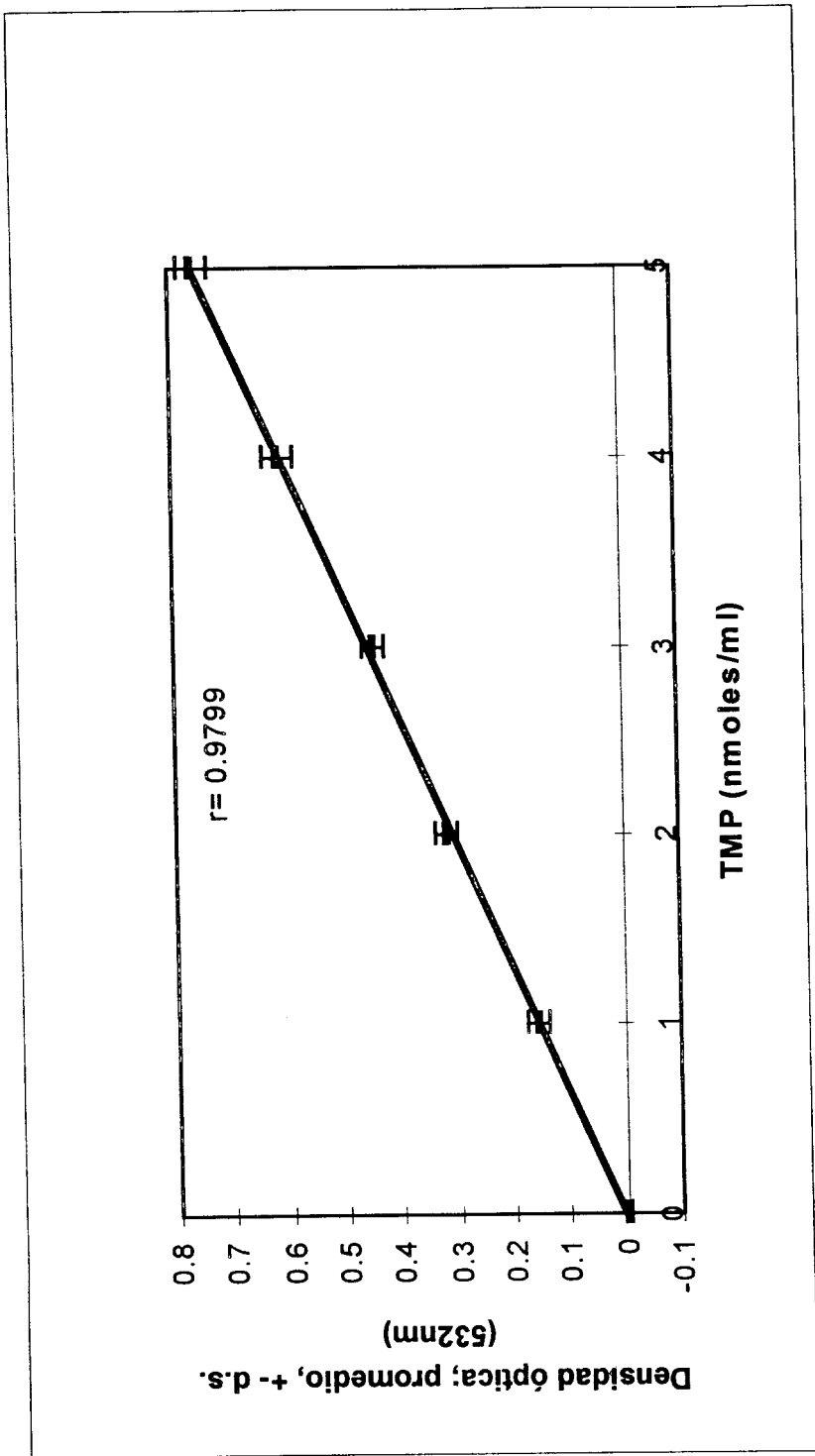


Figura 5. Curva estándar de MDA. La gráfica representa la Densidad Óptica del MDA producido por hidrólisis ácida del TMP (0 a 5 nmol/ml). Cada punto representa la media de 4 determinaciones; las barras de error son desviaciones estándar.

2. Lipoperoxidación de los espermatozoides epididimarios del *C. mexicanus*

Si bien, los epidídimos del *C. mexicanus* habían sido congelados y como pudimos constatar, sus espermatozoides ya se encontraban muertos al momento de ser recuperados del órgano (por el aspecto opaco, aunado a una total inmovilidad y nula recuperación de este parámetro mientras permanecieron en contacto con el medio Ringer), con todo y esto en esos espermatozoides ya se había llevado a cabo la lipoperoxidación, dado a que detectamos una concentración de MDA considerable, en una muestra al tiempo cero del experimento (tabla 4).

3. Efecto del fluido genital femenino sobre la lipoperoxidación en espermatozoides epididimarios del *C. mexicanus*.

En los espermatozoides del murciélago, que fueron incubados durante 22 horas en medio BWW sin albúmina y a temperatura ambiente, hubo un aumento del 140% en la concentración de MDA con respecto a la muestra no incubada (tabla 4), lo que nos indicó que en ellos se llevo a cabo la lipoperoxidación espontánea, como ocurre en los espermatozoides epididimarios del conejo (Alvarez & Storey, 1982) y del ratón (Alvarez & Storey, 1984b), con diferencias interespecíficas y por la concentración iónica del medio de incubación (tabla 3).

Por otra parte, en la muestra de espermatozoides del *C. mexicanus* que fueron incubados y tratados con 100 μ l de FGF, el aumento en la concentración del MDA fue solamente del 100%; es decir, un 40% menos que en la muestra control (tabla 4).

Los datos obtenidos en esta etapa del trabajo, no fueron analizados estadísticamente debido a que solo se cuenta con un experimento realizado; cabe mencionar que la hembra utilizada, había sido inseminada antes de su captura, ya que contenía espermatozoides en el tracto reproductor. Esto a su vez, fue indicador de una actividad protectora sobre los efectos causados por las sustancias reactivas derivadas del oxígeno hacia los espermatozoides, debido a la presencia de factores inhibidores de la lipoperoxidación en el FGF.

Especie	Medio de incubación	MDA (nmol/10 ⁸ células/22hrs)	Cita
Murciélago	BWW sin albúmina	1.619	
Conejo	KTP (alto en potasio) NTP (alto en sodio)	0.990 0.123	Alvarez & Storey, 1982
Ratón	CM (para fertilización in vitro) NTPC (alto en sodio) NTPCA (+ albúmina) TNC (Tris buffer) TNCA (+ albúmina)	1.782 0.858 0.343 6.160 4.840	Alvarez & Storey, 1984

Tabla 3. Datos comparativos de la concentración de malondialdehído (MDA) producidos por 10⁸ espermatozoides, en 22 horas de incubación aeróbica y en diferentes medios, para el murciélago *C. mexicanus*, el conejo y el ratón.

Número de Espermatozoides	Fluido Genital Femenino (μ)	Incubación	MDA(nmol/ml)
[70 x 10 ⁶ /ml]	0	X	0.4673
"	0	t-amb/22h	1.1334
"	100	" "	0.9617

Tabla 4. Efecto del fluido genital femenino sobre la lipoperoxidación en espermatozoides epididimarios del *C. mexicanus*.

4. Efecto del fluido genital femenino del *Corynorhinus mexicanus* sobre la lipoperoxidación en espermatozoides eyaculados de cerdo

Durante la incubación in vitro, en los espermatozoides de cerdo ocurrió la lipoperoxidación espontánea (tabla 5, figura 6).

Las hembras del *Corynorhinus mexicanus* a las que se les extrajo el FGF empleado como factor inhibidor de la lipoperoxidación, en estos experimentos, presentaron espermatozoides en el interior del tracto reproductor, lo que fue indicador de que habían sido inseminadas antes de ser capturadas.

En las muestras de espermatozoides que fueron incubadas y tratadas con diferentes cantidades de FGF, hubo una disminución de la lipoperoxidación, con respecto a las que fueron incubadas solo en el medio control (tabla 5).

Al graficar los resultados, los datos mostraron una correlación lineal negativa ($r = 0.7194$) entre la concentración de MDA producido después de 22 horas por los espermatozoides a 39°C y la cantidad de FGF adicionado al medio de incubación; 0, 50, 100 y 200 μ l respectivamente (figura 6).

Número de Espermatozoides	Fluido Genital Femenino (μ l)	Incubación	MDA (nmol/ml) Promedio \pm d. s.
[100×10^6 /ml]	0	39°C / 22h	1.1367 0.4564
"	50	" "	0.7130 0.3609
"	100	" "	0.5072 0.1603
"	200	" "	0.2904 0.1038

Tabla 5.- Producción de MDA (nmoles) por 100×10^6 espermatozoides eyaculados de cerdo; control y tratados con FGF durante 22h a 39°C. Los datos representan la media y desviación estándar, n= 4.

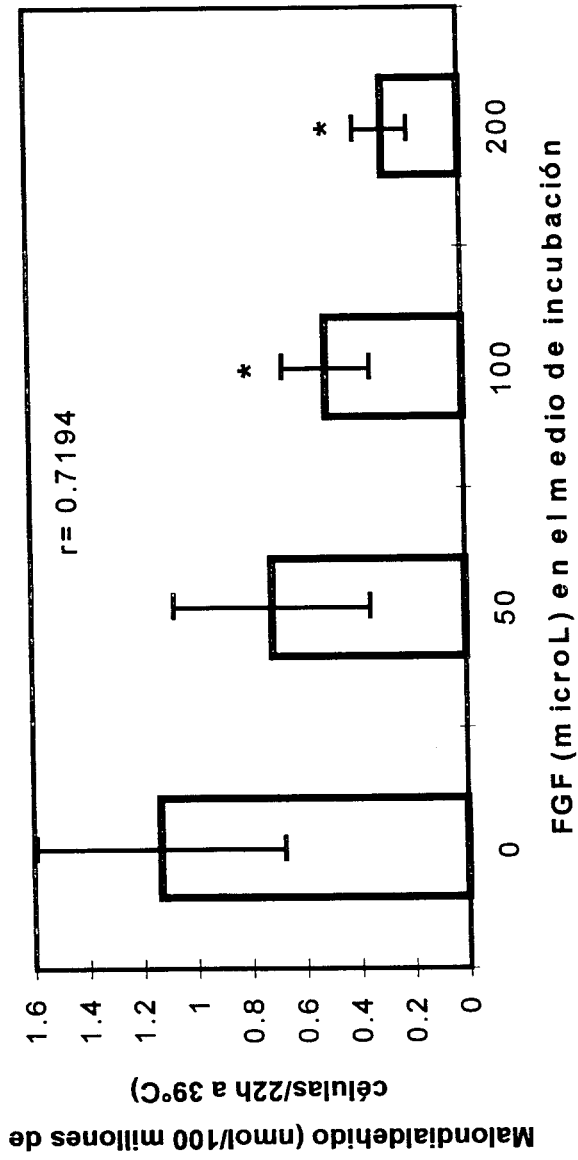


Figura 6. Efecto del FGF sobre la lipoperoxidación en espermatozoides eyaculados de cerdo. Cada columna representa la media de 4 experimentos; las barras de error significan desviaciones estándar. (*) Indica diferencias significativas estadísticamente, con respecto al valor de las muestras control.

Al someter los resultados a un análisis de varianza de una vía, nos indicó que la disminución del MDA entre los diferentes grupos de muestras a cada cantidad de FGF, fue estadísticamente significativa ($F= 5.464$, $P= 0.0133$), con una confianza del 95%, corroborando el análisis de correlación. Y finalmente un análisis de rangos múltiples, aclaró que las diferencias de inhibición de la lipoperoxidación más importantes, se presentaron entre los pares de valores correspondientes a: 0-100 μ l y 0-200 μ l de FGF adicionados al medio de incubación; siendo sus diferencias 0.62950 y 0.84128 respectivamente; es decir, que la disminución de la producción de MDA en las muestras de espermatozoides incubadas por 22 hrs con 100 ó 200 μ l de FGF, fue estadísticamente significativo con respecto a las muestras incubadas solo en el medio control (BWW sin albúmina). Además, tampoco se observaron diferencias entre los pares de 0-50 μ l, 50-100 μ l, 50-200 μ l ni 100-200 μ l de FGF; ya que sus diferencias fueron de: 0.42370, 0.20580, 0.41758 y 0.21178 respectivamente.

222273

DISCUSION

Si bien, es claro que con un solo experimento realizado, no se puede adelantar mucho acerca de la presencia y actividad de lipoperoxidación, por parte de los espermatozoides del murciélago *Corynorhinus mexicanus* y esto, aunado al hecho de la alteración que tuvieron durante el proceso de congelación-descongelación, donde al momento de ser recuperados del epidídimo, presentaron un 0% de movilidad y de viabilidad; aun así, con los resultados obtenidos podemos ver que la concentración de 0.4673 nmoles de MDA producido por 70×10^6 espermatozoides antes de ser incubados, es un valor alto, ya que correspondería a la cantidad producida por 100×10^6 por los homólogos del conejo, durante 10 horas de incubación aeróbica en un medio alto en potasio (Alvarez & Storey, 1982); por 100×10^6 espermatozoides de ratón en un medio alto en sodio después de 12 horas; ó bien a lo producido en 5.5 horas para estos últimos, pero incubados en el medio completo para fertilización in vitro (Alvarez & Storey, 1984b). Esos datos sugieren que los espermatozoides del *C. mexicanus*, son sensibles a las sustancias reactivas derivadas del oxígeno (SRO); sin embargo, no

podemos descartar un efecto peroxidante ocasionado por la conservación en nitrógeno líquido (-165°C) sin el uso de sustancias protectoras antioxidantes.

En cuanto a la lipoperoxidación espontánea, su actividad se encuentra dentro de los valores límites, pero con diferencias de los reportados para otras especies de mamíferos, como se pudo notar en la tabla 4 de resultados. Al respecto, Alvarez y Storey (1982; 1984b), observaron que ocurre una menor tasa de lipoperoxidación en los espermatozoides incubados en un medio cuya composición de iones Na^+ y K^+ es cercana a la de los fluidos oviductal ó extracelular y suponen además que la fuerte dependencia de la peroxidación en los espermatozoides, sobre la composición iónica del medio, involucra una perturbación del equilibrio entre el O_2^- (incapaz de iniciar la cadena de lipoperoxidación), con su ácido conjugado HO_2^- (un potente agente peroxidante) debido a una disminución del pH, como una acción de esos iones en la superficie de las membranas. En nuestro caso, podemos considerar al medio BWW como una solución alta en sodio; sin embargo, el hecho de que los espermatozoides se encontraran muertos al inicio del experimento, implica una actividad iónica alterada, por lo que los resultados en este momento, deben ser tomados con reserva.

Por otra parte, las diferencias no están tan alejadas como para pensar en una composición lipídica muy distinta, en las membranas de los espermatozoides del murciélago (en cuanto al cociente fosfolípidos/colesterol), aspecto que no se ha explorado en esta ni en otras especies de quirópteros y que se sabe, está relacionado con la susceptibilidad hacia las SRO para ser peroxidados (Mann, 1964; Jones & Mann, 1977 (b); Mann & Lutwak-Mann, 1981).

Desde luego, será necesario realizar más experimentos con espermatozoides frescos del *C. mexicanus*, para determinar con precisión la presencia y actividad de lipoperoxidación.

Como lo mencionaron Barratt y Cooke (1991), el estudio de la interacción entre los espermatozoides con el tracto reproductor femenino presenta dificultades técnicas y éticas; sin embargo, el desarrollo de estudios in vitro ha permitido determinar algunos de los efectos fisiológicos de las secreciones del tracto reproductor, dando un

panorama de aproximación a lo que ocurre in vivo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son un aporte en este campo de la investigación, particularmente al conocimiento buscado en torno a las especies que tienen la capacidad de almacenarlos por largo tiempo.

Como pudimos ver en el *C. mexicanus*, especie que almacena los espermatozoides por un periodo de 30 días, que el fluido genital (FGF) obtenido de una hembra adulta e inseminada, mostró actividad antioxidante sobre los espermatozoides homólogos, cuando fueron incubados en BWW sin albúmina por 22 horas a temperatura ambiente.

La presencia de sustancias en el tracto reproductor femenino de los murciélagos, que vuelvan inocuas a las SRO ó bien que detengan ó reviertan el proceso de la lipoperoxidación y que se encuentren actuando durante el periodo del almacenamiento de espermatozoides, es importante considerando que no se han reportado especializaciones morfológicas entre los espermatozoides pre-eyaculatorios y los inseminados, que estuvieran relacionadas con su alta sobrevivencia (Fawcett & Ito, 1965; Wimsatt *et al*, 1966); tampoco las hay con respecto a los espermatozoides de otros mamíferos (Krutzschnig *et al*, 1982).

El desarrollo de un tapón vaginal ocluyendo la salida del tracto reproductor (Racey, 1975; Oh *et al*, 1983; Fenton, 1984); aunado a una menor incidencia de destrucción espermática por fagocitosis leucocitaria y nula evacuación asociado con la relajación del músculo uterino durante el periodo de almacenamiento de espermatozoides (Wimsatt, 1969; Hunter, 1971), nos habla de una estrategia para asegurar la permanencia de esos gametos en el interior del tracto reproductor femenino, actuando de forma coordinada, con mecanismos relacionados más particularmente a la sobrevivencia de los espermatozoides.

Con los trabajos de Racey (1975) y de Crichton *et al*, (1981) sabemos que los espermatozoides inseminados obtienen nutrientes del tejido femenino, sugiriendo que son activos metabólicamente durante el periodo del almacenamiento, de manera importante como para sustentar la movilidad en las etapas iniciales y finales; mientras que, la actividad es reducida en la etapa intermedia, sustentando entonces el

mantenimiento de la integridad celular al disminuirse el gasto energético y probablemente también, la formación de SRO. Con esos datos, solo podemos decir que en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides encuentran un ambiente benigno nutricionalmente por lo que pueden permanecer viables; sin embargo, recordemos que las SRO son generadas a partir del propio metabolismo celular y el que estén activos por largo tiempo, requiere de otro mecanismo que module la formación y reacción de dichas SRO.

Los resultados más claros en este trabajo, a pesar del bajo número de experimentos realizados, fue el hecho de encontrar actividad antiperoxidante por parte del FGF proveniente del *C. mexicanus* sobre los espermatozoides de cerdo. Aun cuando el efecto del FGF no fue dosis-dependiente, ya que solo notamos una disminución de la lipoperoxidación estadísticamente significativa, cuando tratamos a los espermatozoides con 100 ó 200 μ l de FGF con respecto a las muestras incubadas en medio control, la actividad inhibitoria registrada es importante, considerando el volumen alto (800 μ l) ocupado para diluir las secreciones genitales del *C. mexicanus* y el bajo volumen adicionado al medio de incubación. Probablemente, aumentando dicho volumen se obtendría una mayor actividad antiperoxidante.

Con estos resultados, podemos reinterpretar las observaciones hechas por Wimsatt (1969), donde describe una estrecha cercanía de los espermatozoides con el órgano almacenador de murciélagos y la presencia de un forro de mucosubstancias ácidas en el epitelio uterino durante la etapa de almacenamiento de espermatozoides (Racey, 1975); por lo que sugerimos que con esta asociación física, los espermatozoides encuentran además de una fuente de nutrientes, una protección proveniente de factores posiblemente presentes en el forro epitelial, hacia las SRO, manteniendo su integridad estructural y conservando su funcionalidad hasta el momento que es requerida para fertilizar.

De gran relevancia resulta la hipótesis de Crichton *et al*, (1982) indicando que los espermatozoides almacenados en el tracto reproductor femenino de murciélagos, se mantienen inmóviles debido a la presencia de iones zinc en cantidades que inhiben el proceso de capacitación; de corroborarse, esto sería otra pieza del modelo reproductivo

en los murciélagos, ya que como se sabe, la capacitación, una vez iniciada implica un aumento en el consumo de energía (Soupart, 1967). Si realmente se inhibe la capacitación ó se lleva a cabo de manera lenta, esto reduciría la formación de SRO; sin embargo, los murciélagos que presentan un torpor diario y que realizan un almacenamiento prolongado de espermatozoides, se llegan a activar durante una parte del día; los factores inhibidores de la lipoperoxidación serían los moduladores de las fluctuaciones metabólicas entre cada periodo de torpor, sustentando así la sobrevivencia de los espermatozoides.

Haciendo un resumen de los eventos que suceden a partir de que los espermatozoides son inseminados en el tracto reproductor femenino y de los efectos ejercidos por los diferentes fluidos con los que se encuentran a través de su viaje hacia el sitio de fertilización, podemos especular acerca de los probables factores inhibidores de la lipoperoxidación, presentes en el FGF del *C. mexicanus*.

De esa manera, al momento de la eyaculación, los espermatozoides entran en contacto con el plasma seminal, donde componentes como: ergotionina, glutatión reducido, ácido ascórbico y cisteína (Mann, 1964); u otros como: la superóxido dismutasa (SOD) (De Lamirande & Gagnon, 1993 (a)) probablemente sean los factores de antifertilidad y/o descapacitantes reportados por Han *et al*, (1990); ya que estos pueden actuar inhibiendo ó transformando al O_2^- , un radical que actualmente se ha asociado como el disparador de la movilidad hiperactiva y la capacitación de los espermatozoides, cuando su generación es realizada de forma sostenida y a niveles bajos, (De Lamirande & Gagnon, 1993 (b); Kodama *et al*, 1996).

Ya en el tracto reproductor femenino, se ha visto que el fluido uterino de la rata, muestra actividad inhibitoria sobre la movilidad y el metabolismo de los espermatozoides lavados de toro, in vitro; adjudicando dicho efecto al H_2O_2 (Smith & Klebanoff, 1970). Dichos efectos no son totales ya que ciertos componentes como la catalasa, pueden estar presentes también en el fluido uterino y evitar el efecto inhibitor del H_2O_2 al transformarlo en H_2O y O_2 (Smith & Klebanoff, 1970).

Por otra parte, el moco cervical humano (Zhu *et al*, 1992; Zinaman *et al*, 1989) y el fluido oviductal del bovino (Parrish *et al*, 1989; Ehrenwald *et al*, 1990; McNutt & Killian, 1991) y del humano (Zhu *et al*, 1992), se ha visto que promueven la movilidad hiperactiva y la capacitación de los espermatozoides *in vitro*, probablemente gracias a la acción de moléculas como: glicosaminoglucanos tipo heparina, lipoproteínas de alta densidad y/o glicoproteínas.

De manera especulativa, Delamirande & Gagnon (1993a) mencionan la posible existencia de un enzima tipo NADPH-oxidasa similar a la presente en los neutrofilos (Morel *et al*, 1991), en la membrana de los espermatozoides, con la función de producir el O_2^- necesario, para inducir la capacitación y que de existir, esta enzima debe estar quiescente o inhibida al tiempo de la eyaculación, pero debe activarse quizás por alguna de las sustancias mencionadas, después de la separación del plasma seminal y la incubación en la presencia de fluidos biológicos, un proceso que no se ha establecido.

En su trabajo, Zhu *et al*, (1992) reportaron que el fluido oviductal humano puede mantener por largo tiempo la movilidad de los espermatozoides, pero que por si solo, no estimula un aumento en la hiperactividad retardando así la reacción acrosomal. La ventaja de ese retraso *in vivo* es clara, debido a que la capacidad de fertilización de los espermatozoides debe ser retenida tanto como sea posible para asegurar un chance máximo de interacción entre gametos.

Una vez que se ha llevado a cabo la ovulación, el folículo(s) libera su contenido, el cual es probable que llegue hasta los espermatozoides. Los estudios *in vitro* realizados por De Lamirande y Gagnon (1993a), demostraron que una fracción del fluido oviductal humano, donde se encuentran los componentes secundarios (por su bajo peso molecular), promovieron capacitación y reacción acrosomal de los espermatozoides; mientras que la fracción de componentes principales (con alto peso molecular) donde probablemente se encuentre una SOD, evitan ó revierten dichos procesos. Este último aspecto, es interesante, ya que los espermatozoides necesitan mantener su habilidad para realizar la reacción acrosomal, cuando interaccionen con las investimentas del óvulo.

En el caso de las especies que tienen la capacidad de almacenar los espermatozoides en el interior del tracto reproductor femenino, es importante la presencia de los factores que inhiban la lipoperoxidación y limiten el desarrollo de la capacitación hasta un momento cercano a la ovulación; sustentando así, el mantenimiento de la estructura y funcionalidad membranal, evitando al máximo el proceso de la lipoperoxidación, que está asociado con los eventos de envejecimiento y muerte celular. Si en realidad existiera una enzima NADPH-oxidasa en la membrana de los espermatozoides y, ya que el disparo de la capacitación dependería de su actividad al producir O_2^- , el candidato mayor para ser al menos uno de los factores presentes en el FGF sería una enzima SOD u otra con actividad similar; por lo que se requieren futuros estudios enfocados a determinar tanto presencia de la NADPH-oxidasa en los espermatozoides del mamífero en general, como de SOD en el fluido genital femenino del murciélago *C. mexicanus*.

Tampoco podemos descartar la posibilidad de que el factor(es) inhibidor de la lipoperoxidación presente en el FGF, sea otro de las conocidas defensas primarias y secundarias mencionadas en la parte de antecedentes; ó bien, alguna otra molécula de las que se sabe tienen efectos antiperoxidantes. Algunas de ellas, podrían ser: el estradiol ó el 2-hidroxiestradiol; estrógenos que interrumpen la fase de propagación de la lipoperoxidación (Miura *et al*, 1996). Esta hipótesis encuentra sustento en los trabajos de determinación de hormonas en diferentes murciélagos que presentan el fenómeno de la ovulación postergada (y por tanto del almacenamiento prolongado de espermatozoides).

En primera instancia, se ha visto que dichos murciélagos permanecen en una etapa de proestro durante el periodo de apareamiento y continúan así por el periodo de aletargamiento, mientras dura el invierno (Crichton *et al*, 1981; 1982; Krutzsch *et al*, 1982), manteniendo niveles elevados de estrógenos circulantes. Esos altos niveles pueden estar presentes también en el fluido genital femenino mientras dura el periodo de almacenamiento de espermatozoides y ser parte del sistema inhibitorio de la lipoperoxidación, favoreciendo la sobrevivencia prolongada de esos gametos.

CONCLUSION

Este trabajo fue realizado en condiciones in vitro para determinar la presencia en la secreción genital femenina del murciélago *Corynorhinus mexicanus* de factores con actividad inhibitoria sobre la lipoperoxidación; considerando que esta especie de murciélago, al igual que varios otros pertenecientes a las familias Vespertilionidae y Rhinolophidae poseen un mecanismo de fertilización retardada dependiente de un "almacenamiento prolongado" de las células espermáticas en el tracto reproductor femenino. Se utilizó como modelo la determinación de lipoperoxidación durante la incubación aeróbica de espermatozoides epididimarios homólogos y de espermatozoides eyaculados de cerdo. La presencia de estos factores podría constituir un mecanismo protector que sustentara la sobrevivencia de estos gametos.

Los espermatozoides epididimarios del *C. mexicanus*, son capaces de producir lipoperoxidación en presencia de las sustancias reactivas derivadas del oxígeno, ya que presentaron una concentración de malondialdehido correspondiente a 0.47 nmoles por 7×10^7 células en el tiempo cero de nuestras determinaciones, como indicador de la lipoperoxidación. Esto señala que sus membranas tienen una composición lipídica semejante a la de los espermatozoides de otras especies como el ratón y el conejo.

También, en los espermatozoides del *C. mexicanus* ocurre la lipoperoxidación espontánea, como se pudo apreciar por el aumento del 140% en la concentración del malondialdehido, en una muestra que fue incubada en medio control durante 22 horas a temperatura ambiente y con agitación, comparativamente con el valor al tiempo cero del experimento.

La concentración de malondialdehido disminuyó en un 40% en otra de las muestras de espermatozoides del *C. mexicanus*, que fue incubada por 22 horas a temperatura ambiente y tratada con 100µl del fluido genital femenino obtenido de una hembra de la misma especie, con respecto al valor registrado para la muestra incubada en el medio control; indicándonos que en ese fluido biológico existen factores inhibidores de la lipoperoxidación.

En ambos experimentos, los resultados no fueron analizados estadísticamente, debido a que carecimos de un tamaño de muestra representativo, por lo que será necesario repetirlos utilizando muestras frescas de espermatozoides y de fluido genital femenino.

En los espermatozoides eyaculados y lavados de cerdo, ocurrió la lipoperoxidación espontánea como pudimos verificar después de haberlos incubado por 22 horas a 39°C con agitación. Al tratar otras muestras de espermatozoides con diferentes cantidades de fluido genital femenino del *C. mexicanus* (50, 100 y 200 µl respectivamente), detectamos una disminución en la concentración de malondialdehido como indicador de la lipoperoxidación, con respecto al valor de la muestra control; los datos presentaron un coeficiente de correlación lineal y negativo entre la concentración de malondialdehido y la cantidad de fluido genital femenino adicionado al medio de incubación ($r = 0.7194$). Además, un análisis de rangos múltiples (parejas de datos) indicó, que la disminución en la lipoperoxidación fue estadísticamente significativo cuando las muestras fueron tratadas con 100 ó 200 µl de fluido genital femenino, con respecto a los valores registrados para las muestras control ó tratadas con 50 µl de fluido genital.

Estos últimos resultados corroboran lo encontrado en los experimentos realizados entre los espermatozoides epididimarios del *C. mexicanus* y el fluido genital femenino; por lo que podemos concluir que la presencia y actividad de factores inhibidores de la lipoperoxidación en la secreción genital femenina de los murciélagos, es un importante mecanismo por el que probablemente los espermatozoides almacenados in vivo en el interior del tracto reproductor permanecen viables por largo tiempo, manteniendo su integridad estructural al disminuirse los posibles daños sobre los lípidos de membrana, conservando su capacidad de fertilización.

BIBLIOGRAFIA

- AITKEN R.J., 1991. Reactive Oxygen Species and Human Sperm Function. En: Comparative Spermatology 20 Years After; B., Baccetti (Edit.). Serono Series Vol. 75. Raven Press. Pp. 787-792.
- AITKEN J.R., BUCKINGHAM D., WEST K., WU C.F., ZIKOPOULUS K., and RICHARDSON W.D., 1992. Differential Contribution of Leucocytes and Spermatozoa to the Generation of Reactive Oxygen Species in the Ejaculates of Oligozoospermic Patients and Fertile Donors. J. Reprod. Fert. 94: 451-462.
- AITKEN J.R., and CLARKSON S.J., 1987. Cellular Basis of Defective Sperm Function And its Association with the Genesis of Reactive Oxygen Species by Human Spermatozoa. J. Reprod. Fert. 81: 459-469.
- ALVAREZ G.J. and STOREY T.B. 1982. Spontaneous Lipid Peroxidation in Rabbit Epididymal Spermatozoa: Its Effects on Sperm Motility. Biol. Reprod. 27:1102-1108.
- ALVAREZ G.J., and STOREY T.B., 1984 (a). Assessment of Cell Damage Caused by Spontaneous Lipid Peroxidation in Rabbit Spermatozoa. Biol. Reprod. 30: 323-331
- ALVAREZ G.J., and STOREY T.B., 1984 (b). Lipid Peroxidation and the Reactions of Superoxide and Hydrogen Peroxide in Mouse Spermatozoa. Biol. Reprod. 30: 833-841.
- ALVAREZ G.J., and STOREY T.B., 1985. Spontaneous Lipid Peroxidation in Rabbit and Mouse Epididymal Spermatozoa: Dependence of Rate on Temperature and Oxygen Concentration. Biol. Reprod. 32: 342-351.

- ALVAREZ G.J., TOUCHSTONE C.J., BLASCO L., and STOREY T.B., 1987. Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide In Human Spermatozoa. Superoxide Dismutase as Major Enzyme Protectant Against Oxygen Toxicity. *J. Androl.* 8: 338-348.
- BARBER A.A., and BERNHEIM F., 1967. Lipid Peroxidation: its Measurement, Occurrence, and Significance in Animal Tissues. *Adv. Gerontol. Res.* 2: 355-403.
- BARRATT C.L.R., and COOKE I.D., 1991. Spermatozoa and the Human Female Reproductive Tract – a review. *Int. J. Androl.* 14: 394-411.
- BIGGERS, J.D., WHITTEN, W.K. and WHITTINGHAM, D.G. 1971. The Culture of Mouse Embryos *in vitro*. En *Methods of Mammalian Embryology*; J.C. Daniel (Edit.), Freeman, San Francisco. Pp. 93-116.
- BELL M., WANG R., HELLSTROM G.W.J., and SIKKA C.S., 1993. Effect of Cryoprotective Additives and Cryopreservation Protocol on Sperm Membrane Lipid Peroxidation and Recovery of Motile Human Sperm. *J. Androl.* Vol. 14, 6: 472-478.
- BISHOP D.W., 1956. Oxygen Concentrations in the Rabbit genital Tract. *Proc. Third Int. Congr. Anim. Reprod.* Pp. 53-55.
- CADENAS E., 1989. Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- CALVIN H.I., 1974. Keratinoid proteins in the heads and Tails of Mammalian Spermatozoa. En: *Biology of the Male Gamete*; J. G. Duckett and P.A. Racey (Edits.), Academic Press, London. Pp. 257-273.
- CALVIN H.I., 1979. Electrophoretic Evidence for the Identity of the Major zinc-Binding Polypeptides in the Rat Sperm Tail. *Biol. Reprod.* 21: 873-882.

- CARTER, D.C. 1970. Chiropteran Reproduction. En: About Bats; B.H. Slaughter and D.H. Walton (Eds.), Southern Methodist Univ. Press. Dallas. Pp. 233-246.
- CHVAPIL M., 1973. New Aspects in the Biological Role of Zinc: A Stabilizer of Macromolecules and Biological Membranes. Life Sci. 13: 1041-1049.
- CHVAPIL M., 1976. Effect of Zinc on cells and Biomembranes. Med. Clin. N. Am. 60: 799-812.
- CRICHTON G.E., KRUTZSCH H.P., and WIMSATT W.A., 1981. Studies on Prolonged Spermatozoa Survival in Chiroptera- I. The Role of Uterine Free Fructose in the Spermatozoa Storage Phenomenon. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 70-A: 387-395.
- CRICHTON G.E., KRUTZSCH H.P., and CHVAPIL M., 1982. Studies on Prolonged Spermatozoa Survival in Chiroptera- II. The Role of Zinc in the Spermatozoa Storage Phenomenon. Comp. Biochem. Physiol. 71(A): 71-77.
- CRICHTON G.E., KRUTZSCH H.P., and YANAGIMACHI R., 1993. Stability of the Sperm Plasma Membrane of Hibernating Bat (*Myotis velifer*) Compared with other Mammals. J. Reprod. Fertil. 97: 1-4.
- DE LAMIRANDE E., and GAGNON C., 1993(a). Human Sperm Hyperactivation and Capacitation as Parts of an Oxidative Process. Free Rad. Biol. Med. 14: 157-166.
- DE LAMIRANDE E., EILEY D., and GAGNON C., 1993(b). Inverse Relationship Between the Induction of Human Sperm Capacitation and Spontaneous Acrosome Reaction by Various Biological Fluids and the Superoxide Scavenging Capacity of these Fluids. Int. J. Androl. 16: 258-266.
- DELGADO N.M., HUACUJA L., PANCARDO R., and ROSADO A., 1975. Modification of Human Sperm Metabolism by the Induced Release of Intracellular Zinc. Life Sci.

16: 1483-1488.

DEMPLE B., 1991. Regulation of bacterial Oxidative Stress Genes. *Annu. Rev. Genet.* 25: 315-337.

DROBNIS E.Z., and OVERSTREET J.W., 1992. 1. Natural History of Mammalian Spermatozoa in the Female Reproductive Tract. En: *Oxford Review of Reproductive Biology*; S.R. Milligan (Edit.). Vol. 14, Oxford University Press., New York. Pp. 1-45.

DUKELOW W.K., and RIEGLE G.D., 1974. Transport of Gametes and Survival of the Ovum as Functions of the Oviduct. En: *The Oviduct and its Functions*; A.D. Johnson and C.E. Foley (Eds.), Academic Press, New York. Pp. 193-220.

EHRENWALD E., FOOTE R.H., and PARKS J.E., 1990. Bovine Oviductal Fluid Components and their Potential Role in Sperm Cholesterol Efflux. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 195-204.

ELIASSON R., 1971. Inhibitory Effects of Human Seminal Plasma on the oxygen Consumption of Mitochondria. *Life Sci.* 10: 407-409.

FAWCETT D.W., 1970. A Comparative View of Sperm Ultrastructure. *Biol. Reprod.* 2: 90-127.

FAWCETT D.W., and ITO S., 1965. The Fine Structure of Bat Spermatozoa. *Am. J. Anat.* 116: 567-610.

FENTON B.M., 1984. Sperm Competition? The Case of Vespertilionid and Rhinolophid Bats. En: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating System*; R.L. Smith (Edit.), Academic Press. Pp. 573-587.

FRIDOVICH I. 1978. The Biology of Oxygen Radicals. *Science* 201: 875-880.

- GAGNON C., IWASAKI A., De LAMIRANDE E. and KOVALSKI N., 1991. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. En: The Male Germ Cell: Spermatogonium to Fertilization; B. Robaire (Edit.), Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 637, Pp. 436-443.
- GATES W.H., 1936. Keeping bats in Captivity. J. Mammal. 17: 268-273.
- GOPALAKRISHNA A., and MADHAVAN A., 1971. Survival of Spermatozoa in the Female Genital Tract of the Indian Vespertilionid bat, *Pipistrellus ceylonicus chrysothrix* (Wroughton). Proc. Indian Acad. Sci. B 73: 43-49.
- GRIREAU F. J., DUMONT E., RENARD P., CALLEGARI P. J., and Le LANNOU D., 1995. Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Enzymatic Defence Systems in Human Spermatozoa. J. Reprod. Fert. 103: 17-26.
- GUNN S.A., and GOULD T.C., 1958. Role of Zinc in Fertility and Fecundity in the Rat. Am. J. Physiol. 193: 505-508.
- HALL, E.R. 1981. The Mammals of the North America. John Wiley and Sons, Vol. 1:XV+600+1-90.
- HALLIWEL B., and GUTTERIDGE J.M.C. (Edits.), 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, Second Edition; Clarendon press, Oxford. Pp. 180-276.
- HAN H.L., MACK S.R., DEJONGE C., and ZANEVELD L.J.D., 1990. Inhibition of the Human Sperm Acrosome Reaction by High Molecular Weight Factor from Human Seminal Plasma. Fertil. Steril. 54: 1177-1179.
- HANDLEY, C.O., Jr. 1959. A Revision of American Bats of the Genera of *Euderma* and *Plecotus*. Proc. U.S. Nat. Mus. 110:95-246.
- HARRISON R.A.P., 1977. The Metabolism of Mammalian Spermatozoa. En: Frontiers in

Reproduction and Fertility Control, parte 2; R.O. Greep and M.A. Koblinsky (Edits.) MIT Press, Cambridge, Massachusetts. Pp. 379-401.

HIRAIWA Y.K., and UCHIDA T., 1956. Fertilization Capacity of Spermatozoa Stored in the Uterus After the Copulation in the Fall. *Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 31: 565-674.

HOLLAND M.K., and STOREY T.B., 1981. Oxygen Metabolism of Mammalian Spermatozoa. Generation of Hydrogen Peroxide by Rabbit Epididymal Spermatozoa. *Biochem. J.* 198: 273-280.

HOLLAND M.K., SUTER D.A.I., and WHITE I.G., 1976. Possible Mechanisms involved in the Reduction in Motility of Human Spermatozoa by Copper, Zinc and Silver. *J. Reprod. Fertil.* 46: 507-508.

HOSKEN D.J., O'SHEA J.E., and BLACKBERRY M.A., 1996. Blood Plasma Concentrations of Progesterone, Sperm Storage and Sperm Viability and Fertility in Goul's Wattled Bat (*Chalinolobus gouldii*). *J. Reprod. Fertil.* 108: 171-177.

HUACUJA L., SOSA A., DELGADO N.M., and ROSADO A., 1973. A Kinetic Study of the Participation of Zinc in Human Spermatozoa Metabolism. *Life Sci.* 13: 1383-1394.

HUNTER R.H.F., 1980. Physiology and Thechnology of Reproduction in Female Domestic Animals. Academic Press, New York.

HUNTER A.G., JOHNSON W.L., BARKER L.D.S., FAHNING M.L., and SCHULTZ R.H., 1971. Bat Seminal Vesicle protein: its Characterization and Physiological Properties. *J. Reprod. Fertil.* 24: 179-186.

JERRET D.P., 1979. Female reproductive Patterns in Nonhibernating Bats. *J. Reprod. Fertil.* 56: 369-378.

- JONES R., and MANN T., 1973. Lipid Peroxidation in Spermatozoa. Proc. R. Soc. London B. 184: 103-107.
- JONES R., and MANN T., 1976. Lipid Peroxides in Spermatozoa; Formation, Role of Plasmalogen and Physiological Significance. Proc. R. Soc. Lond. B. 193: 317-333.
- JONES R., and MANN T., 1977 (a). Toxicity of Exogenous Fatty Acid Peroxides Towards Spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 50: 255-260.
- JONES R., and MANN T., 1977 (b). Damage to Ram Spermatozoa by Peroxidation of Endogenous Phospholipids. J. Reprod. Fertil. 50: 261-268.
- KODAMA H., KURIBAYASHI Y., and GAGNON C., 1996. Effect of Sperm Lipid Peroxidation on Fertilization. J. Androl. Vol. 17, 2: 151-157.
- KOOPMAN, K.F. 1974. Eastern Limits of *Plecotus* in Mexico. J. Mamm., 55:872-873.
- KRISHNA A., and DOMINIC C.J., 1978. Storage of Spermatozoa in the Female Genital Tract of the Vespertilionid Bat, *Scotophilus heati*. J. Reprod. Fertil. 54: 319-321.
- KRUTZSCH, P. H., CRICHTON G. E., and NAGLE B.R., 1982. Studies on Prolonged Spermatozoa Survival in Chiroptera: A Morphological Examination of Storage and Clearance of Intrauterine and Cauda Epididymal Spermatozoa in the Bats *Myotis Lucifugus* and *Myotis velifer*. Am. J. Anat. 165: 421-434.
- KVIST U., and ELIASSON R., 1978. Zinc Dependent Chromatin Stability in Human Ejaculated Spermatozoa. Int. J. Androl. Suppl. 1, 178.
- LENZI A., PICARDO M., GANDINI L. N., and DONDERO F., 1996. Lipids of the sperm Plasma membrane: From Polyunsaturated Fatty Acids Considered as Markers of Sperm Function to possible Scavengers Therapy. Human Reproduction Update. Vol. 2, 3: 246-256.

- LOPEZ, W.R. 1989. Biología de *Plecotus mexicanus* (Chiroptera: Vepertilionidae) en el Estado de Tlaxcala, México. Tesis Doctoral UNAM, México. 227 P.
- MAAS D.H.A., STOREY B.T., and MASTROIANNI L., 1976. Oxygen Tension in the Oviduct of the Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*). Fertil. Steril. 27: 1312-1317.
- MANN T., 1964. The Biochemistry of Semen and the Male Reproductive Tract. Methuen and Co., London. Pp. 493.
- MANN T., and LUTWAK – MANN C. (Edits.), 1981. Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag, Heidelberg. Pp. 495.
- MANN T., JONES R., and SHERINS R., 1980. Oxygen Damage, Lipid Peroxidation and Motility of Spermatozoa. En: Testicular Development, Structure and Function; A. Steinberger and E. Steinberger (Eds.). Raven Press, New York. Pp. 497-501.
- MASTROIANNI L., and JONES R., 1965. Oxygen Tension within the Rabbit Fallopian Tube. J. Reprod. Fertil. 9: 99-102.
- McINTOSH J.E.A., and LUTWAK – MANN C., 1972. Zinc Transport in Rabbit Tissues. Some Hormonal Aspects of the Turnover of Zinc in Female Reproductive Organs, Liver and Body Fluids. Biochem. J. 126: 869-876.
- McNUTT T.L., and KILLIAN G.J., 1991. Influence of Bovine Follicular and Oviduct Fluids On Sperm Capacitation in vitro. J. Adrol. 12: 244-252.
- MIURA T., MURAOKA S., and OGISO T., 1996. Inhibition of Lipid Peroxidation by Estradiol and 2-Hydroxyestradiol. Steroids. 61: 379-383.
- MOREL F., DOUSSIERE J., and VIGNAIS P.V., 1991. The Superoxide-Generating Oxidase of Phagocytic Cells. Physiological, Molecular and Pathological Aspects. Eur. J. Biochem. 201: 523-546.

- MORTIMER D., and TAYLOR P.J., 1990. Interpretation of Semen Analysis. *Gynaecology*. February, 23-25.
- MYERS P., 1977. Patterns of Reproduction of Four Species of Vespertilionids Bats in Paraguay. Univ. Calif. Publ. Zool. University of California press, LTD. 107: 1-41.
- NAQUI A., CHANCE B., and CADENAS E., 1986. Reactive Oxygen Intermediates in Biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 137-166.
- NEVO A.C., 1965. Dependence of Sperm Motility and Respiration on Oxygen Concentration. *J. Reprod. Fert.* 9: 103-107.
- OH K.Y., MÔRI T., and UCHIDA A.T., 1983. Studies on the Vaginal Plug of the Japanese Greater Horseshoe Bat, *Rhinolophus ferrumequinum nippon*. *J. Reprod. Fertil.* 68: 365-369.
- OXBERRY, B.A. 1979. Female Reproductive Patterns in Hibernating bats. *J. Reprod. Fert.* 56:359-367.
- PAGENSTECHE H.A., 1859. Über Die Begattung Von *Vesperugo pipistrellus*. *Verh. Naturh. Med. Ver. Heideb.* 1: 194-195.
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J.L., HANDROW R.R., SIMS M.M., and FIRST N.L., 1989. Capacitation of Bovine Spermatozoa by Oviduct Fluid. *Biol. Reprod.* 40: 1020-1025.
- PEARSON P.O., KOFORD R.M., and PEARSON K.A., 1952. Reproduction of the Lump-Nosed Bat (*Corynorhinus rafinesquei*) in California. *J. Mamm.* Vol. 33, 3: 273-320.

- PHILLIPS D.M., and MAHLER S., 1977. Phagocytosis of Spermatozoa by the Rabbit Vagina. *Anat. Rec.* 189: 61-72.
- POTTS D.M., and RACEY P.A., 1971. A Light and Electron Microscope Study of Early Development in the Bat *Pipistrellus pipistrellus* . *Micron.* 2: 322-348.
- RACEY P.A. 1973. The Viability of Spermatozoa After Prolonged Storage by Male and Female European Bats. *Period. Biol.* 75: 201-205
- RACEY P.A. 1975. The Prolonged Survival of Spermatozoa in Bats. En: *The Biology of the Male Gamete*; J.G. Duckett and P.A. Racey (Edits.), Academic Press, London. Pp. 385-416.
- RACEY P.A. 1979. The Prolonged Storage and Survival of Spermatozoa in Chiroptera. *J. Reprod. Fert.*, 56:391-402.
- REDENZ E., 1929. Das Verhalten der Säugetierspermatozoen Zwischen Begattung und Befruchtung. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 9: 734-749.
- REID B.L., 1965. The Fate of Uterine Spermatozoa in the Mouse Post Coitum. *Aust.J. Zool.* 13: 189-199.
- RESTALL B.J., 1967. The biochemical and Physiological Relationships Between the Gametes and the Female Reproductive Tract. *Adv. Reprod. Physiol.* 2:181-212.
- RICHARDSON B.A., 1979. The Anterior Pituitary and Reproduction in Bats. *J. Reprod. Fertil.* 56: 379-389.
- ROSADO A., HICKS J.J., MARTINEZ-ZEDILLO G., BONDANI A., and MARTINEZ-MANAU TOU J., 1970. Inhibition of Human Sperm Motility by Cadmium and Zinc Ions. *Contraception.* 2: 259-273.

- SAITO S., BUSH I.M., and WHITMORE W.F., 1967. The Effects of Certain metals and Chelating Agents on Rat and Dog Epididymal Spermatozoan Motility. *Fert. Steril.* 18: 517-529.
- SELLEY L.M., LACEY J.M., BARTLETT R.M., COPELAND M.C., and ARDLIE G.N., 1991. Content of Significant Amounts of a Cytotoxic End-Product of Lipid Peroxidation in Human Semen. *J. Reprod. Fertil.* 92: 291-298.
- SMITH C.D., and KLEBANOFF J.S., 1970. A Uterine Fluid-Mediated Sperm Inhibitory System. *Biol. Reprod.* 3: 229-235.
- SNAITH S.M., HAY A.J., and LEVY G.A., 1971. The Relationships Between the α -Manosidase Activity and the Zinc Content of Mammalian Sex Organs. *J. Endocr.* 50: 659-667.
- SOUPART P. 1967. Studies on the Hormonal Control of Rabbit Sperm Capacitation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2: 49-63.
- TAPPEL L.A., and ZALKIN H., 1959. Lipid Peroxidation in Isolated Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 80: 326-332.
- TORREILLES J., BONNES-TAOUREL D., GUERIN M.C., and 1992. Is Malonaldehyde a Valuable Indicator of Lipid Peroxidation?. *Biochem. Pharm.* Vol. 44, 5: 985-988.
- TUMLISON R., 1992. *Plecotus mexicanus*. *Mammalian Species.* 401: 1-3.
- UCHIDA T.A., and MORI T., 1972. Electron Microscope Studies on the Fine Structure of Germ Cells in Chiroptera 1. Spermiogenesis in Some Bats and Notes on its Phylogenetic Significance. *Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 26: 399-418.

UCHIDA T.A., and MÔRI T., 1987. Prolonged Storage of Spermatozoa in Hibernating Bats. En: Recent Advances in the Study of Bats; M.B. Fenton, P.A. Racey and J.M.V. Rayner (Edits.) University Press, Cambridge. Pp. 351-356.

VAN BLERKOM J., and MOTTA P., 1979. The Cellular Basis of Mammalian Reproduction. Urban and Schwarzenberg, Baltimore and Munich. 222273

WHITE I.G., 1955. The Toxicity of Heavy Metals to Mammalian Spermatozoa. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 33: 359-366.

WIMSATT W.A., 1944. Further Studies on the Survival of Spermatozoa in the Female Reproductive Tract of the Bat. Anat. Rec. 88: 193-204.

WIMSATT, W.A. 1960. Some Problems of Reproduction in Relation to Hibernation in Bats. Bull. Mus. Comp. Zool. Harv., 124:249-267.

WIMSATT W.A., 1969. Some Interrelations of Reproduction and Hibernation in Mammals. Symp. Soc. Exp. Biol. 23: 511-549.

WIMSATT W.A., KRUTZSCH P.H., and NAPOLITANO L., 1966. Studies on Sperm Survival Mechanisms in the Female Reproductive Trac of Hibernating Bats. I. Cytology and Ultra-structure of Intra-uterine Spermatozoa in *Myotis lucifugus*. Am. J. Anat. 119: 25-60.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1980. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Seminal-Cervical Mucus Interaction. M.A. Belsey, R. Eliasson, A.J. Gallegos, K.S. Moghissi, C.A. Paulson and M.R.N. Prasad. (Eds.). Press Concern Singapore UK. Pp. 11-15.

YANAGIMACHI R., 1994. Mammalian Fertilization. En: The Physiology of Reproduction, Second Edition; E. Knobil and J.D. Neil (Eds.). Raven Press, Ltd., New York. Pp. 190-196.

YU P.B. 1994. Cellular Defenses Against Damage from Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews*. Vol. 74, 1: 139-162.

ZHU J.J., BARRATT C.L.R., and COOKE I.D., 1992. Effect of Human Cervical Mucus on Human Sperm Motion and Hyperactivation in vitro. *Hum. Reprod.* 7: 1402-1406.

ZINAMAN M., DROBNIS E.Z., MORALES P., BRAZIL C., KIEL M., and CROSS N., 1989. The Physiology of Sperm Recovered from the Human Cervix: Acrosomal Status and Response to Inducers of the Acrosome Reaction. *Biol. Reprod.* 41: 790-797.