



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Maestría en Biología de la Reproducción Animal

“Identificación de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 en epididimo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*, así como su posible participación en la maduración espermática epididimaria”

T E S I S

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

P R E S E N T A

Biol. Julio César González Caballero

2202800657

cbs2202800657@xanum.uam.mx

Comité tutorial

Codirectores: Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Dr. Julio César Chávez Zamora

Asesora: Dra. Edith Arenas Ríos (Presidente)

Ciudad de México a 26 de abril de 2023

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 05 de Abril de 2023

Comisión Académica del Posgrado
Maestría en Biología de la Reproducción Animal
Presente

El(La) que suscribe Julio César González Caballero alumno(a) con número de matrícula 2202800657, del posgrado Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación Identificación de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 en epidídimo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*, así como su posible participación en la maduración espermática epididimaria a desarrollar en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



___ Julio César González Caballero ___
Nombre completo y firma autógrafa

Declaración de originalidad

El que suscribe Julio César González Caballero, alumno del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada:

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestro en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o **moral** que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el

Atentamente





Identificación de CRISPI, ADAM7 y PMCA4 en epididimo del murciélago Corynorhinus mexicanus, así como su posible participación en la maduración espermatica epididimaria.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 26 del mes de abril del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH ARENAS RIOS
DRA. MA. DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: JULIO CESAR GONZALEZ CABALLERO

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

APROBAR

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


JULIO CESAR GONZALEZ CABALLERO
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DRA. MA. DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ

VOCAL

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

SECRETARIO

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

COMITÉ TUTORAL

Codirectores

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

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

Dr. Julio César Chávez Zamora

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

Asesora

Dra. Edith Arenas Ríos

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

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Edith Arenas Ríos (Presidente)

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

Dra. María del Carmen Beltrán Núñez (Vocal)

Consortio de Fisiología del Espermatozoide
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Carmen.beltran@ibt.unam.mx

Dr. Miguel Ángel León Galván (Secretario)

Laboratorio de Ecología y Biología de Mamíferos
Departamento en Biología
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
leon@xanum.uam.mx

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana (Vocal)

Laboratorio de Andrología
Departamento en Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
reyna@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Universidad Autónoma Metropolitana, la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro: 003797.

Que para la realización de los de maestría, el alumno Julio César González Caballero que contó con el apoyo de la beca CONACYT con número de registro CVU: 1080668.

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Identificación de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 en epidídimo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*, así como su posible participación en la maduración espermática epididimaria” con fecha (fecha del examen oral).

INDICE

1 Introducción	1
1.1 El epidídimo	1
1.2 Maduración espermática epididimaria	3
1.3 Proteínas involucradas en el proceso de maduración espermática epididimaria	4
1.3.1 Expresión de Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína (CRISP) en epidídimo y espermatozoides de mamíferos	4
1.3.2 Expresión de Desintegrina y Metaloproteasa 7 (ADAM7) en epidídimo y espermatozoides de mamíferos	10
1.3.3 Expresión de ATPasa de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática isoforma 4 (PMCA4) en epidídimo y espermatozoides de mamíferos	12
2 Antecedentes	15
5.1 Maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoide en el epidídimo de <i>Corynorhinus mexicanus</i>	15
5.2 Proteínas relacionadas con el potencial fértil en espermatozoides de <i>Corynorhinus mexicanus</i>	16
3 Planteamiento del problema	17
4 Justificación	17
5 Pregunta de investigación	18
6 Hipótesis	18
7 Objetivos	18
7.1 Objetivo general	18
7.2 Objetivos específicos	18

8 Material y métodos	18
8.1 Obtención de ejemplares	18
8.2 Obtención de testículos y epidídimos	19
8.3 Procesamiento histológico	19
8.4 Identificación inmunohistoquímica de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 en epidídimo de <i>C. mexicanus</i> .	19
8.5 Análisis filogenético de CRISP1, ADAM7 y PMCA4	20
8.6 análisis estadístico	21
9 Resultados y discusión	22
10 Conclusión	39
11 Bibliografía	40
12 Anexos	54
13 Lista de abreviaciones	59

RESUMEN

Los espermatozoides producidos en los testículos carecen de toda capacidad de fecundar al ovocito, para ello deben experimentar una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que le van a permitir adquirir dicha capacidad. Durante la maduración espermática epididimaria el espermatozoide va adquiriendo proteínas durante su viaje por el epidídimo, algunas de estas se asocian a su membrana de manera temporal y algunas otras permanecen aún después de ser eyaculados. Algunas de estas proteínas son exclusivas del epidídimo y participan activamente en la maduración epididimaria principalmente en especies, cuya maduración en general finaliza en la región distal del cuerpo del epidídimo, esta última característica general en mamíferos es distinta en *Corynorhinus mexicanus*, cuya maduración finaliza en la región caudal del epidídimo y se ha asociado a un almacenamiento prolongado de hasta 5 meses. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue, identificar la presencia de CRISP1, PMCA4 y ADAM7 en epidídimo de *C. mexicanus* e inferir su posible participación en la maduración. El análisis filogenético identifico la presencia de las proteínas de interés CRISP1, PMCA4 y ADAM7 dentro del grupo quiróptera dando evidencia indirecta de la presencia de dichas proteínas en *C. mexicanus*. La inmunofluorescencia realizada para las fechas de Octubre (maduración) y febrero (final del almacenamiento) mostraron la presencia de CRISP1, PMCA4 y ADAM7 en todo el tejido epididimario. En octubre CRISP1 no mostró diferencia de expresión entre las regiones del epidídimo, PMCA4 tuvo mayor expresión en la cauda al igual que ADAM7. Posiblemente las tres proteínas estén participando activamente en la maduración a través del mantenimiento del tejido epididimario para brindar un ambiente luminal adecuado, mientras que en el espermatozoide estén regulando la entrada de calcio, evitando su acumulación y en la correcta osmolaridad por parte de los espermatozoides. Inclusive parece ser que al menos la expresión de PMCA4 es de importancia para la regresión del tejido epididimario y eliminación de espermatozoides por apoptosis, que marcara el inicio del periodo de inactividad reproductiva.

ABSTRACT

The sperm produced in the testicles lack any capacity to fertilize the oocyte, for this they must undergo a series of morphological, physiological and biochemical changes that will allow them to acquire this capacity. During epididymal sperm maturation, the spermatozoon acquires proteins during its journey through the epididymis, some of these are temporarily associated with its membrane and some others remain even after being ejaculated. Some of these proteins are exclusive to the epididymis and actively participate in epididymal maturation, mainly in species, whose maturation generally ends in the distal region of the body of the epididymis. This last general characteristic in mammals is different in *Corynorhinus mexicanus*, whose maturation ends in the epididymis. caudal region of the epididymis and has been associated with prolonged storage of up to 5 months. Therefore, the objective of this work was to identify the presence of CRISP1, PMCA4 and ADAM7 in the epididymis of *C. mexicanus* and infer their possible participation in maturation. The phylogenetic analysis identified the presence of the proteins of interest CRISP1, PMCA4 and ADAM7 within the bat group, giving indirect evidence of the presence of these proteins in *C. mexicanus*. Immunofluorescence performed for the dates of October (maturation) and February (final storage) showed the presence of CRISP1, PMCA4 and ADAM7 in all epididymal tissue. In October CRISP1 did not show a difference in expression between the regions of the epididymis, PMCA4 had higher expression in the cauda, as did ADAM7. Possibly the three proteins are actively participating in maturation by maintaining the epididymal tissue to provide an adequate luminal environment, while calcium entry is being regulated in the spermatozoon, preventing its accumulation and correct osmolarity by the spermatozoa. . It even seems that at least the expression of PMCA4 is of importance for the regression of the epididymal tissue and elimination of spermatozoa by apoptosis, which will mark the beginning of the period of reproductive inactivity.

Introducción

Los espermatozoides son producidos en los túbulos seminíferos testiculares masculinas durante un proceso conocido como espermatogénesis. A partir de las espermatogonias que se dividen por mitosis se generan los espermatoцитos primarios, mismos que exhibirán una primera división meiótica dando lugar a los espermatoцитos secundarios. Estos último presentan una segunda división meiótica que dará origen a las espermátidas redondas que, finalmente, se diferenciarán como espermatozoides elongados, a través de una serie de cambios morfológicos, conocidos como espermiogénesis (Nishimura & L'Hernault, 2017). Los espermatozoides estructuralmente formados son liberados a la luz de los túbulos seminíferos durante la espermiación (Nishimura & L'Hernault, 2017).

En el espacio intraluminal, los gametos masculinos comienzan su tránsito a través de la *rete testis*, en dirección a los conductos eferentes, que se encargarán de la reabsorción de aproximadamente el 50-96% del fluido de los túbulos seminíferos. Esta reabsorción consiste en el transporte de solutos, permeabilidad pasiva del agua y endocitosis que estará favorecida por la expresión de proteínas como: el intercambiador Na^+/H^+ isoforma 3 (SLC9A3), acuaporinas (AQP1 y 9), anhidrasa carbónica 2 (CAR2), el regulador de la conductancia transmembranal de fibrosis quística (CFTR) y la ATPasa de Na^+/K^+ que facilitan el equilibrio iónico entre la luz del túbulo y la sangre (Hess, 2018).

Posteriormente, los espermatozoides ingresan al conducto epididimario. Sin embargo, debido a su alto nivel de especialización, los gametos masculinos son transcripcional y traduccionalmente silenciosos (Gervasi & Visconti, 2017) e incapaces de fecundar al ovocito, por lo que durante su recorrido por el epidídimo lograrán adquirir su capacidad fértil (Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015).

El Epidídimo

El epidídimo es un órgano altamente contorneado que realiza las siguientes funciones: transporte, maduración, protección y almacenamiento de espermatozoides (Robaire & Hinton, 2015). Anatómicamente se divide en cuatro

regiones mayores: *segmento principal*, sitio que conecta el túbulo epididimario con los conductos eferentes y el primero en recibir los espermatozoides provenientes de los testículos; *caput* y *corpus*, sitios en dónde se lleva a cabo la maduración espermática en los mamíferos y, por último; la *cauda*, sitio en donde se almacenan los espermatozoides hasta la eyaculación (Chang, 2002; Robaire & Hinton, 2015; Rodríguez-Tobón, 2016).

En los mamíferos, se reconocen diferentes tipos celulares que constituyen el tejido epitelial epididimario y que interactúan con los espermatozoides conforme transitan por este órgano, estos son: células principales, caracterizadas por sintetizar proteínas que posteriormente son liberadas al espacio luminal donde se mantienen libremente activas o interactúan con el espermatozoide; células apicales, presentan una función endocítica de diferentes sustancias incluyendo proteínas desde el lumen, función que, comparten con las células estrechas, que además tienen una función secretora de H^+ ; células claras, presentan una gran actividad endocítica del contenido presente en las gotas citoplasmáticas liberadas de los espermatozoides, incluyendo diferentes proteínas específicas, además de estar involucradas en la acidificación del pH luminal; las células basales, que presentan gránulos de secreción típicos de otras células secretoras (Robaire & Hinton, 2015).

El contenido secretado por las células basales tiene la función de regular a las células principales que, a su vez, regulan el volumen y la presión del lumen a través del transporte de electrolitos y agua (Robaire & Hinton, 2015). Por último; las células halo (monocitos y linfocitos) y las células dendríticas (macrófagos), son importantes en la naturaleza inmunológica del epidídimo (Robaire & Hinton, 2015; Zhou *et al.*, 2018) para proteger a los espermatozoides de patógenos y de ser destruidos por el sistema inmune ante lesiones tisulares (Voisin *et al.*, 2019).

En conjunto, por el papel que juegan y por las diferencias en la expresión génica de los diferentes tipos celulares, así como por la concentración de iones luminales presentes en cada una de las regiones del epidídimo, se generan las características microambientales necesarias para que los espermatozoides adquieran su capacidad de fecundar al ovocito, proceso conocido como maduración espermática

epididimaria (Zhou *et al.*, 2018) que para la mayoría de los mamíferos estudiados culmina en la región distal del *corpus* del epidídimo (Robaire *et al.*, 2006; Cornwall, 2009; Rodríguez-Tobón, 2016 Gervasi & Visconti, 2017).

Maduración espermática epididimaria

El proceso de maduración espermática epididimaria involucra una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en los espermatozoides (Cornwall, 2009) que favorecen: la adquisición de la movilidad progresiva, migración de la gota citoplasmática, aumento en la carga negativa de la membrana plasmática, cambios en el coeficiente fosfolípidos: colesterol, restructuración o remodelación de la forma del acrosoma, disminución del diámetro de las mitocondrias, modificaciones postraduccionales, adquisición y liberación de proteínas (Cornwall, 2009; Rodríguez-Tobón, 2016 Gervasi & Visconti, 2017).

Durante la maduración epididimaria, la modificación en el cociente fosfolípidos:colesterol provoca un cambio en la fluidez de membrana plasmática del espermatozoide, favoreciendo la estabilización de esta durante su tránsito y almacenamiento por el epidídimo, así como para establecer la organización molecular necesaria para la capacitación, la reacción del acrosomal y la fusión con el ovocito, procesos que ocurren en el tracto reproductor femenino (Rodríguez-Tobón, 2011; Gervasi & Visconti, 2017).

El ambiente iónico del lumen del túbulo epididimario juega un papel esencial durante la maduración de los espermatozoides, la concentración de los iones Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , HCO_3^- y Mg^{2+} disminuye desde la región del *caput* hacia la región de la *cauda*, mientras que la concentración de los fosfatos y del K^+ incrementa (Robaire & Hinton, 2015). El intercambio iónico entre el lumen y los espermatozoides favorece la movilidad de estos gametos, y promueve que entren en un estado de quiescencia durante su almacenamiento (Robaire & Hinton, 2015). Por otra parte, la composición proteica de los espermatozoides cambia a medida que alcanzan su maduración, la cantidad y el tipo de proteínas presentes en la superficie celular se modifica por adquisición, eliminación o son modificadas durante su tránsito por el epidídimo (Cornwall, 2009). En particular, las glicoproteínas presentes en el glicocálix del

espermatozoide suelen ser modificadas por enzimas glicohidrolasas y glicosiltransferasas, que rompen o transfieren residuos de azúcar respectivamente.

Un ejemplo claro del cambio en la composición de glicoproteínas en la membrana de los espermatozoides es el incremento de ácido siálico desde la región del *caput* hacia la *cauda* del epidídimo, que favorece el incremento de la carga negativa de la membrana del espermatozoide (Robaire & Hinton, 2015; Rodríguez-Tobón, 2016). Sin embargo, muchas proteínas presentan modificaciones postraduccionales como fosforilación en sus residuos de serina, treonina y tirosina, oxidación de grupos tiol que permiten la estabilización de proteínas estructurales a través de la formación de puentes disulfuro (S-S) principalmente en el flagelo y núcleo del espermatozoide, como modificaciones fundamentales para la adquisición de la movilidad progresiva (Gervasi & Visconti, 2017).

Existe una gran cantidad de proteínas que interaccionan con los espermatozoides durante su maduración, algunas de ellas son P26h, P34h, SPAG11, Eppin, y las proteínas de la familia de Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína (CRISP) (Cornwall, 2009), estas últimas, son de interés en el presente estudio, ya que al ser adquiridas durante la maduración y por el papel que tienen para la fecundación del ovocito (Gaikwad *et al.*, 2020), su presencia en los espermatozoides puede ser empleado como un indicador de maduración.

Proteínas involucradas en el proceso de maduración epididimaria

Expresión de Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína (CRISP) en epidídimo y espermatozoides de mamíferos

Las proteínas secretoras ricas en cisteína de la superfamilia CAP (Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína, Antígeno 5, Relacionado con la Patogénesis 1), antes conocidas como glicoproteínas de recubrimiento espermático (SCP) (Gibbs *et al.*, 2008), son glicoproteínas que tienen un peso de entre 20-30 kDa, con 16 residuos de cisteína altamente conservados formando puentes disulfuro (Ellerman *et al.*, 2006; Vicens & Treviño, 2018). Las CRISP presentan un dominio N-terminal y un

dominio C-terminal rico en cisteína (CRD) conformado por una bisagra y un dominio regulador de canal iónico (ICR) (Nolan *et al.*, 2006; Vicens & Treviño, 2018).

Se conocen cuatro formas de CRISP: CRISP1, CRISP2, CRISP3 y CRISP4, esta última, solo ha sido reportada en rata y ratón. Todas ellas participan en diversos eventos reproductivos desde la espermatogénesis, maduración epididimaria, capacitación y fertilización del ovocito (Vicens & Treviño, 2018), además de que el parentesco filogenético entre varias especies establecido a partir de la estructura de estas proteínas sugiere un papel funcional conservado en la reproducción en mamíferos (Gibbs *et al.*, 2008).

Comparando con otros vertebrados, la similitud estructural del 65% entre los dominios N-terminal y C-terminal rico en cisteína presente entre las CRISP de mamíferos y reptiles (Roberts *et al.*, 2002, Roberts *et al.*, 2006; Vicens & Treviño, 2018), ha llevado a considerar que una proteína CRISP ancestral localizada en las glándulas salivales, mutó hacia un componente de veneno en reptiles (Fry, 2005), mientras que, en los mamíferos, por selección positiva (Vicens & Treviño, 2018), es decir, nuevas mutaciones que tienden a ser benéficas y que evolucionan rápidamente para alcanzar su fijación en el genoma (Kosiol *et al.*, 2008), selección sexual y neofuncionalización, provocaron mutaciones en los aminoácidos del dominio ICR, promoviendo marcadas diferencias interespecíficas en la actividad reguladora de las CRISP (Vicens y Treviño, 2018; Arévalo *et al.*, 2020).

Por lo tanto, la adaptación molecular de las CRISPs infiere que estas poseen una amplia diversidad de sustratos e interacciones específicas con canales iónicos en diferentes especies (Vicens y Treviño, 2018), como ya lo han demostrado estudios previos en murinos de la capacidad que poseen CRISP1, CRISP2 y CRISP4 para regular los canales CatSper (Ernesto *et al.*, 2015), al Receptor de Rianodina (RyR) (Gibbs *et al.*, 2006) y al canal catiónico Receptor de Potencial Transitorio subfamilia melastatina (M) miembro 8 (TRPM8) (Gibbs *et al.*, 2011), respectivamente.

En el caso de CRISP1, 2 y 3, se ha observado a través de análisis filogenéticos que, estas proteínas son resultado de duplicaciones de un mismo gen. CRISP1, 2 y 3 de humano se encuentran en el locus 6p21.3. En ratón se encuentran en el cromosoma

17B2, y el gen adicional CRISP4, se localiza en el cromosoma 1A3 de ratón (Gaikwad *et al.*, 2020), siendo esto, la posible razón de encontrar ortólogos entre diferentes especies, generando problemas para clasificarlas principalmente en cuanto a su numeración (Arévalo *et al.*, 2020).

CRISP4 de rata, presenta una similitud del 91% con CRISP4 de ratón, y 69% con CRISP1 de humano, caso contrario con CRISP4 de ratón que, presenta una similitud del 59% con CRISP1 humano, mientras que CRISP1 de ratón presenta una similitud del 40% con CRISP1 de humano (Gaikwad *et al.*, 2020). Por ello, la realización de análisis filogenéticos, inclusive evolutivos en estudios enfocados a la identificación de la expresión de las proteínas en tejido puede permitir clasificarlas de manera más adecuada, sin caer en identificaciones confusas.

Se ha identificado durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, que la presencia de CRISP1 es expresada de manera ascendente desde la región distal del *caput* a la región caudal del epidídimo en ratas, ratones (Cohen *et al.*, 2000a; Cohen *et al.*, 2000b), humanos (Hayashi *et al.*, 1996; Krätzschar *et al.*, 1996) y macacos (Sivashanmugam *et al.*, 1999). CRISP4 también se encuentra involucrada en la maduración de los espermatozoides, ya que se ha identificado su expresión en los segmentos de *caput* y *corpus* de epidídimo, disminuyendo hacia la región caudal en ratas y ratones (Jalkanen *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006). Específicamente, CRISP1 y CRISP4 son secretadas por las células principales del epidídimo (Weigel-Muñoz *et al.*, 2019). En este caso, CRISP1 forma oligómeros de una manera dependiente del Zn^{2+} , a través de la unión de dos residuos de histidina altamente conservados del dominio CAP de la proteína con el ion Zn^{2+} (Maldera *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2021).

Una vez formados los oligómeros de CRISP1 dependiente de Zn^{2+} , estos se anclan a una proteína de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) específica presente en las balsas lipídicas de los epididimosomas para posteriormente ser transferida a un dominio específico de las balsas lipídicas del espermatozoide (Sullivan *et al.*, 2007; Sullivan & Saez, 2013; Sullivan, 2015) como se ha observado en otras proteínas como P26h,

tras ser extraídas de prostasomas y espermatozoides de hámsteres por tratamiento con fosfolipasa C específico para fosfatidilinositol (Légaré *et al.*, 1999).

En el caso de CRISP1 y 4 están localizadas en el flagelo y cabeza del espermatozoide (Gaikwad *et al.*, 2020). Sin embargo, hasta el momento, no hay estudios enfocados en la expresión de CRISP en quirópteros.

Un metaanálisis filogenético del genoma y transcriptoma de 18 especies de murciélagos realizado por Hawkins *et al.* (2019) identificó 181 genes ortólogos sometidos a selección positiva, siendo sólo el 15.8% involucrados en la reproducción, en donde fue localizado CRISP3. Mientras que, la filogenia realizada por Gaikwad *et al.* (2020) predice la presencia de CRISP1 y CRISP2 en quirópteros.

Sin embargo, la identificación de la expresión de estas CRISP en tejido para quirópteros, así como una filogenia específica para los mismos sigue sin ser abordada, más aún si se consideran las posibles implicaciones que tendrían estas proteínas en una especie de murciélago que presenta ciertas adaptaciones reproductivas, como es el caso de *Corynorhinus mexicanus* (León-Galván *et al.*, 2005; Vicens y Treviño, 2018; Gaikwad *et al.*, 2020).

Se ha descrito que CRISP1 es adquirido por los espermatozoides durante su tránsito por el *caput* y *cauda* del epidídimo; presenta un papel como factor decapacitante durante la maduración epididimaria (Cohen *et al.*, 2000a;b), y se sabe que, esta proteína presenta dos isoformas conocidas como D y E (Cohen *et al.*, 2000b; Roberts *et al.*, 2008), cuya diferencia radica en la presencia del epítipo mAb 4E9 de 2 kDa ubicado en el extremo N-terminal de la proteína E que no está presente en las formas completas y procesadas proteolíticamente de la proteína D (Roberts *et al.*, 2002).

Particularmente, la forma D de CRISP1 se encuentra en la región dorsal del acrosoma del espermatozoide de ratón (Cohen *et al.*, 2000a), la cual se une de manera transitoria hasta ser liberada en la capacitación (Roberts *et al.*, 2008), se considera que esta proteína mientras se mantenga temporalmente unida, será la encargada de inhibir la capacitación de los espermatozoides durante su

almacenamiento en la región caudal del epidídimo de ahí su papel como factor decapacitante (Roberts *et al.*, 2003, Roberts *et al.*, 2008). Aún se desconoce el mecanismo por el cual la capacitación es inhibida por CRISP1.

En comparación con la proteína D, la proteína E se une fuertemente a la superficie del espermatozoide, específicamente en el flagelo (Cohen *et al.*, 2000b; Roberts *et al.*, 2002), dada esta fuerte afinidad y que los estudios no muestran una diferencia entre las formas D y E de CRISP1, pero si la presencia de una proteína CRISP1 fuertemente unida en la región del acrosoma, se le atribuye un papel funcional en la unión/fusión del espermatozoide con el ovocito (Cohen *et al.*, 2000a), sin embargo, aún no quedan claras las funciones individuales de las proteínas D y E, dada la localización de cada forma, se considera que la proteína D tiene funciones específicas en la cabeza del espermatozoide, mientras que la proteína E en el flagelo (Roberts *et al.*, 2002). Por ahora, los estudios recientes no hacen distinción entre las dos formas de CRISP1, pero se está ampliando la información sobre su importancia en la fertilidad en los eventos de capacitación, interacción con la zona pelúcida y fusión de gametos (Weigel-Muñoz *et al.*, 2019).

Una de las características que presentan los espermatozoides durante su maduración en el epidídimo es la adquisición de la movilidad progresiva, pues se sabe que la concentración de Ca^{2+} en el medio luminal epididimario disminuye desde la región del *caput* hacia la región de la *cauda* del epidídimo, por lo que el Ca^{2+} es un ion clave para la movilidad (Dacheux *et al.*, 2014).

De manera general, los espermatozoides de la cabeza y cuerpo del epidídimo, es posible que exhiban una entrada de Ca^{2+} al flagelo a través de los receptores purinérgicos (PR) o del canal específico de espermatozoides CatSper, provocando la activación de la adenilato ciclasa soluble (sAC), y un aumento de la concentración de AMPc para dar paso a la movilidad flagelar (Dacheux *et al.*, 2014), a esta acción se le suma el HCO_3^- , incrementando la producción de AMPc y acelerando el batido flagelar (Wennemuth *et al.*, 2003).

La adquisición de la movilidad de los espermatozoides durante la maduración espermática epididimaria se da por la entrada de Ca^{2+} , provocando un aumento de

AMPC que activa el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rap (RAPGEF) que a su vez activa la proteína serina/treonina cinasa (AKT) que fosforila los residuos de serina de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) inactivándola, lo que provoca una disminución de la fosforilación de GSK-3 sobre la subunidad reguladora 2 de PP1 (PPP1R2) la cual, inhibe la actividad de la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1). Por otro lado, una disminución en la actividad de la proteína fosfatasa metilesterasa 1 (PPME1) incrementa la metilación de la isoforma alfa de la fosfoproteína fosfatasa 2A (PPP2CA) inactivándose e incrementando la fosforilación de GSK3. La inactivación de GSK3 conlleva a la fosforilación de PPP1R2 activándola e inhibiendo a la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1) resultando en la adquisición de la movilidad por parte del espermatozoide. Durante la adquisición de la movilidad es posible que la vía sAC/AMPC/ proteína cinasa A (PKA) interaccione con las vías mencionadas anteriormente para la adquisición de la movilidad (Freitas *et al.*, 2017).

Por otro lado, las bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular y luminal presentes en la región caudal del epidídimo (Dacheux *et al.*, 2014) sumado al reciente descubrimiento de la capacidad de CRISP1 de inhibir canales de Ca^{2+} como CatSper y TRPM8 (Ernesto *et al.*, 2015), y de CRISP4 de inhibir a TRPM8 (Gibbs *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018), son evidencia de que estas proteínas participan no sólo en la adquisición de la movilidad progresiva, sino también en el almacenamiento de los espermatozoides, propiciando su quiescencia (Dacheux *et al.*, 2014).

La inhibición de CatSper y TRPM8 posiblemente se lleve a cabo por la unión entre CRISP con alguna de las subunidades que componen a estos canales iónicos, por ejemplo, CRISP2 que puede anclarse a la subunidad CATSPER1 para ejercer su función sobre el canal CatSper (Lim *et al.*, 2019).

Además, tanto CRISP1 como CRISP4 parecen tener un papel complementario e individual en la adquisición de la movilidad progresiva. Los espermatozoides nulos de cada proteína y/o doble knockout muestran una movilidad progresiva disminuida y alteraciones en sus patrones de movimiento (Hu *et al.*, 2018; Carvajal *et al.*, 2018).

Por lo tanto, es posible que CRISP1 y 4 regulen el flujo Ca^{2+} extra e intracelular en el espermatozoide a través de los canales CatSper y TRPM8 (De Blas et al., 2009; Sun et al., 2017) permitiendo la activación de la movilidad progresiva (Dacheux et al., 2014; Freitas et al., 2017).

La fosforilación de los residuos de tirosinas (P-Tyr) es un evento bioquímico importante para la maduración de los espermatozoides (Rodríguez-Tobón, 2016), muestra de ello es una reducción en la P-Tyr de la cabeza de los espermatozoides de rata de caput a cauda del epidídimo, así como un incremento en la repuesta de AMPc en espermatozoides de la cauda (Lewis & Aitken, 2001).

Las proteínas CRISP1 y CRISP4 también están involucradas en la P-Tyr, ya que los espermatozoides de ratón *knout* de cada proteína y doble *knout* muestran una fosforilación de los residuos de tirosinas (P-Tyr) disminuida o inhibida (Roberts et al., 2003; Hu et al., 2018).

Por lo tanto, la exhibición de una P-Tyr adecuada durante la maduración va a ser importante para que el espermatozoide pueda llevar a cabo la capacitación, hiperactivación y reacción acrosomal posteriormente en el tracto de la hembra (Aitken et al., 2007).

En esto último, la participación de CRISP1 sobre la fosforilación de tirosinas parece estar determinada por su capacidad de regular canales iónicos (Ernesto et al., 2015), conforme los niveles de Ca^{2+} en general disminuyen hacia la *cauda* del epidídimo (Dacheux et al., 2014) disminuye la fosforilación (Lewis & Aitken, 2001).

Por otro lado, la expresión diferencial de CRISP1 y CRISP4 en el epidídimo (Nolan et al., 2006) indican que ambas proteínas participan en la maduración de los espermatozoides por vías compartidas e individuales relacionados con la movilidad y P-Tyr para posteriormente actuar como un factor de decapitación durante el almacenamiento de los espermatozoides en la *cauda* del epidídimo (Hu et al., 2018).

Expresión de Desintegrina y Metaloproteasa 7 (ADAM7) en epidídimo y espermatozoides de mamíferos

ADAM son una familia de proteínas transmembranales conformada por 33 miembros, comparten una estructura multidominio conformada por una secuencia señal N-terminal, un pro-dominio, una metaloproteínasa, una desintegrina, un dominio rico en cisteína, un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF), una región transmembranal y una cola citoplasmática (Kim *et al.*, 2006). En humanos y ratones, se ha identificado la expresión de ADAM7 en todo el epidídimo (Sun *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2005), esta proteína es sintetizada por las células del tejido epitelial y secretada hacia la luz del epidídimo, se asocia a epididimosomas para ser transferida a la membrana celular de los espermatozoides (Liu *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2009) durante la maduración espermática.

La ausencia de ADAM7 provoca anomalías estructurales y fisiológicas tanto en los espermatozoides como en el tejido epitelial, como se ha reportado en ratones nulos para ADAM7, que presentan una disminución en la altura del epitelio del *caput* del epidídimo que se asocia a una disminución en la P-Tyr, así como movilidad reducida y anomalías en el flagelo del espermatozoide (Choi *et al.*, 2015), ocasionado por los cambios en el ambiente luminal y a la incapacidad del espermatozoide de poder regular de manera adecuada su osmolaridad, generando deficiencias estructurales y fisiológicas que finalmente afectan el proceso de fecundación (Choi *et al.*, 2015).

Por otra parte, ADAM7 interactúa con otras proteínas como ADAM2, ADAM3 (Kim *et al.*, 2006), con la proteína de choque térmico A5 (HSPA5), con calnexina y la proteína integral de membrana 2B (ITM2B) (Han *et al.*, 2011). Se sabe que ADAM2 y ADAM3 forman un complejo ADAM2/3, y que la ausencia de una provoca una disminución de la otra (Nishimura *et al.* 2007) además de una expresión disminuida de ADAM7 (Kim *et al.*, 2006). En ratones knockout de ADAM7 se ha observado que los espermatozoides presentan una inadecuada capacidad de osmorregulación que provoca malformaciones en el flagelo y, una disminución en la P-Tyr y en la movilidad (Choi *et al.*, 2015). Por lo que, la expresión normal de las tres ADAM le va a conferir al espermatozoide madurar en el epidídimo para poder fecundar al

ovocito (Yuan *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 1998; Nishimura *et al.* 2001) dada la relación existente entre las tres proteínas (Kim *et al.*, 2006).

Además de la interacción con otros ADAM, ADAM7 forma un complejo con la proteína integral de membrana tipo II (ITM2B); una proteína relacionada con enfermedades neuropatológicas (Han *et al.*, 2011). La formación del complejo ADAM7/ITM2B incrementa en cantidad de manera dependiente de la región del epidídimo y durante la capacitación espermática (Han *et al.*, 2011), dicho incremento del complejo se da por un cambio biofísico en ADAM7 que permite la formación del complejo con L-ITM2B en los microdominios de las balsas lipídicas de los espermatozoides, donde las chaperonas HSPA5 y Canx (Han *et al.*, 2011); que participan en el plegamiento y ensamblaje de proteínas en el retículo endoplasmático (Sitia & Braakman, 2003), interactúan con ADAM7 para la formación del complejo ADAM7/L-ITM2B o brindan estabilización durante su formación (Han *et al.*, 2011). Dicho complejo participa en la interacción espermatozoide-ovulo a través de un reconocimiento molecular multimérico (Nixon *et al.*, 2005).

Expresión de ATPasa de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática isoforma 4 (PMCA4) en epidídimo y espermatozoides de mamíferos

El calcio y las señales dependientes de Ca^{2+} son indispensables para el desarrollo de los procesos de la maduración y capacidad de fecundación de los espermatozoides. En general, la absorción epitelial para el transporte de iones a través de las células puede ocurrir a través de dos vías: una es la vía paracelular, en la que los gradientes electroquímicos dirigen pasivamente los iones a través de las uniones estrechas y del espacio paracelular; la otra es la vía transcelular, que implica varios pasos, incluida la absorción apical activa y el tráfico intracelular, así como la secreción basolateral. Debido a que el gradiente transepitelial de Ca^{2+} no soporta la absorción pasiva de Ca^{2+} a través de la vía paracelular, se espera que la absorción transcelular de Ca^{2+} sea la vía principal de absorción de Ca^{2+} en el epidídimo (Shum *et al.*, 2022).

El transporte transcelular de Ca^{2+} a través del epitelio es un proceso de varios pasos, comenzando con la entrada pasiva de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} en la membrana apical de las células del epidídimo seguida de difusión a través del citosol facilitada por unión a proteínas de unión a Ca^{2+} intracelulares y eventualmente la extrusión a través de las membranas basolaterales por intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que requieren energía, ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), que operan en contra del gradiente electroquímico de Ca^{2+} (Shum *et al.*, 2022).

El fuerte gradiente de Ca^{2+} entre los espacios intra y extracelular es mantenido por PMCA. Se han identificado 4 isoformas (PMCA1-4) cada una de ellas codificada por un distinto gen (Brandenburger *et al.*, 2011). Por corte-empalme alternativo, >30 variantes de empalme de las cuatro PMCA se han podido generar. Las principales regiones de empalme de las PMCA están ubicadas en las regiones N- y C-terminal. Mientras que PMCA1 y 4 se expresan de forma ubicua, PMCA2 y 3 están restringidas a un número limitado de tejidos. Las otras isoformas de PMCA y variantes de empalme muestran un patrón de expresión específico en células y tejidos. Estudios en ratones knockout para PMCA1, PMCA2 o PMCA4 apuntan a importantes funciones *in vivo* de las diferentes isoformas. Se ha determinado que los ratones homocigotos con un gen blanco de delección para PMCA4 son infértiles, debido a una motilidad de los espermatozoides gravemente deteriorada (Brandenburger *et al.*, 2011).

Se conoce que la concentración de Ca^{2+} en el medio luminal epididimario disminuye desde la región de *caput* hacia la *cauda* del epidídimo, partiendo de 1.3 mM en el segmento inicial a 0.25mM en la *cauda*, por lo que se considera que el Ca^{2+} es clave para la movilidad de los espermatozoides (Dacheux *et al.*, 2014; Shum *et al.*, 2022).

PMCA4a es una variante de PMCA4 localizada en roedores, se transfiere a los espermatozoides desde la membrana apical del tejido epididimario a partir de secreciones apócrinas (epididimosomas) durante la maduración de los espermatozoides (Patel *et al.*, 2013). Los ratones nulos para PMCA4 muestran una espermatogénesis y comportamiento de apareamiento normales, pero los

espermatozoides no pueden alcanzar un estado hiperactivado de movilidad durante el proceso de capacitación espermática y por ende se presenta infertilidad (Brandenburger *et al.*, 2011).

Por lo tanto, el papel de PMCA4 es fundamental en la regulación de la función espermática sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular (Brandenburger *et al.*, 2011) al mantener bajas las concentraciones de Ca^{2+} en los espermatozoides de ratón, ya que, la contribución del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), el uniportador mitocondrial (MICU) y la ATPasa- Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) son mínimas (Wennemuth *et al.*, 2003).

Particularmente, cuando los espermatozoides llegan a la región caudal del epidídimo para posteriormente ser liberados durante la eyaculación, se presenta un cambio significativo en las concentraciones de calcio, que actuara como segundo mensajero en las vías de señalización favoreciendo la movilidad hiperactivada durante la capacitación espermática. Por lo que, la regulación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por parte de PMCA4 en los espermatozoides que transitan por el epidídimo de *caput a cauda* es fundamental.

Cabe señalar que, los estudios antes mencionados fueron realizados en modelos animales que presentan un patrón reproductivo continuo, en dónde la maduración de los espermatozoides culmina en la región distal del *corpus* del epidídimo. Sin embargo, se desconoce si existen diferencias en la expresión de proteínas relacionada con la maduración de los espermatozoides en especies que cuenten con almacenamiento prolongado de espermatozoides. Es por lo anterior que, *C. mexicanus* resulta ser un modelo adecuado para el estudio de las proteínas involucradas en la maduración de los gametos, ya que, los eventos de adquisición de la movilidad progresiva y exhibición de P-Tyr en el epidídimo, resultan interesantes en este modelo, a pesar de que los espermatozoides han alcanzado la *cauda* del epidídimo, estos aún continúan madurando, además de que se mantienen almacenados durante un periodo prolongado de tiempo (León-Galván *et al.*, 2005; Rodríguez-Tobón, 2016). Por tanto, la expresión y participación de CRISP1, ADAM7

y PMCA4 durante la maduración epididimaria en *C. mexicanus* podría ser completamente diferente a la generalidad de mamíferos.

Antecedentes

Patrón reproductivo de *Corynorhinus mexicanus*

El murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*, presenta asincronía en sus funciones reproductivas. En el caso del macho, la espermatogénesis, ocurre en verano, con respecto al periodo de receptividad de las hembras (otoño) (León-Galván *et al.*, 2005). Para que esta asincronía sea factible, los machos llevan a cabo un almacenamiento prolongado de espermatozoides que puede durar hasta por 5 meses (septiembre-enero) en la región caudal del túbulo epididimario, permitiendo con esto la sincronización entre machos y hembras durante el periodo de cópulas (noviembre-diciembre) (León-Galván *et al.*, 2005; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015). Posteriormente se determinó que la maduración espermática epididimaria en *C. mexicanus* finaliza en la región caudal del epidídimo, y se considera dependiente del tiempo de almacenamiento, es decir, los espermatozoides requieren de un mayor tiempo de estancia en la *cauda* del epidídimo para completar su maduración (Rodríguez-Tobón *et al.* 2016).

Cervantes *et al.* (2008), al someter espermatozoides de las tres regiones del epidídimo a capacitación y reacción acrosomal *in vitro*, considerando que sólo los espermatozoides maduros tienen la capacidad de presentar ambos procesos, observaron un incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados del 19.4% de septiembre a octubre en la región del *corpus*, mientras que a partir del 11 al 23 de septiembre, los espermatozoides de la *cauda* se capacitaron significativamente en ~30%, además, la inducción de la reacción del acrosoma con progesterona, incremento de septiembre a octubre en el *corpus* y un aumento del 11 al 23 de septiembre en la *cauda*.

El trabajo posterior de Rodríguez-Tobón *et al.* (2016), corroboró los resultados de Cervantes *et al.* (2008), quienes encontraron un incremento del 30% de espermatozoides capacitados de la región *caudal* con respecto a *caput* y *corpus*.

Sin embargo, en contraste con lo reportado por Cervantes *et al.* (2008), no observaron cambios en el porcentaje de espermatozoides que presentaron reacción acrosomal entre las regiones y las diferentes fechas. Además, mediante la cuantificación de P-Tyr, Rodríguez-Tobón *et al.* (2016) informaron que la fosforilación de proteínas se incrementa un mes después de que los espermatozoides ingresan a la región caudal del epidídimo. Ambos trabajos, muestran claramente que el proceso de maduración de los espermatozoides en *C. mexicanus* continua en la región *caudal* del epidídimo y se asocia con el tiempo prolongado de almacenamiento de los espermatozoides.

Proteínas relacionadas con el potencial fértil en espermatozoides de *Corynorhinus mexicanus*

Recientemente, se reportó la expresión funcional del canal específico de espermatozoides CatSper, en *C. mexicanus* (Mendoza *et al.*, 2022), donde se registró un incremento en la respuesta a Ca^{2+} dependiente de la concentración (0.3 μM , 1 μM y 3 μM) de progesterona (P_4) por parte de los espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo (Mendoza *et al.*, 2022). El uso de la P_4 es clave, esto porque se encuentra liberada de manera natural por las células del cúmulo que rodean al óvulo en el tracto reproductor femenino en humanos (Sun *et al.*, 2017). Además, se conoce que la P_4 permite la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide (Harper *et al.*, 2004) a través de CatSper (Sun *et al.*, 2017). Además del estímulo por P_4 , las mediciones electrofisiológicas de espermatozoide por patch-clamp reguladas al alza por estímulo de NH_4Cl y posterior inhibición por RU1968 (inhibidor específico de CatSper) sugieren la presencia de CatSper en espermatozoides de *C. mexicanus* durante los primeros meses de almacenamiento en la *cauda* epididimaria (Mendoza *et al.*, 2022).

Por lo anterior, esta investigación pretende caracterizar la presencia de al menos una proteína que permita la regulación de canales de Ca^{2+} (CRISP1), el ingreso o salida de Ca^{2+} (PMAC4) y de alguna involucrada en la maduración de los espermatozoides (ADAM7) durante su tránsito por el epidídimo en el murciélago *C. mexicanus*.

Planteamiento del problema

Varios estudios sobre proteínas y canales iónicos que se consideran participes en la maduración espermática epididimaria se han enfocado principalmente en su papel durante la fecundación, proporcionando evidencia de manera indirecta de su posible participación en la maduración epididimaria y almacenamiento en la región caudal del epidídimo. Por otro lado, en el caso de los modelos murinos, en sus patrones reproductivos no se tiene establecido un tiempo determinado que permita distinguir de manera individual los procesos de maduración y almacenamiento, sino que estos están marcados por regiones, es decir, en el cuerpo finaliza la maduración mientras que en la cauda se almacenan los espermatozoides. Por lo que, el no tener una distinción entre el tiempo cuando ocurre el inicio de la maduración y consecutivamente el almacenamiento espermático, hace complicado realizar estudios enfocados en reconocer cómo diversas proteínas y canales iónicos participan directamente en la maduración, así como los mecanismos moleculares y las vías de señalización involucradas en dicho proceso. Por esta razón, y dada las características del patrón reproductivo de *C. mexicanus*, esta especie de murciélago es un modelo adecuado para el estudio sobre la función de diferentes proteínas y canales iónicos durante la maduración y el almacenamiento en la *cauda* del epidídimo.

Justificación

Tomando en consideración el patrón reproductivo asincrónico de *Corynorhinus mexicanus* que involucra un almacenamiento de los espermatozoides hasta el momento en que las hembras se encuentran receptivas, y el hecho de que la maduración epididimaria llega a término en la región caudal del epidídimo, identificar las proteínas CRISP1, ADAM7 y la bomba PMCA4 que cumplen una función en el proceso de la maduración epididimaria, abre la posibilidad de desarrollar futuros estudios enfocados en el entendimiento de los mecanismos moleculares y vías de señalización involucradas en cómo los espermatozoides adquieren su movilidad progresiva, sobre el factor decapacitante, el control del ambiente luminal, el transporte de iones al interior del espermatozoide entre otros aspectos.

Pregunta de investigación

¿Existe expresión de las proteínas CRISP 1, ADAM7 y de la bomba de calcio PMCA4 en el epidídimo de *Corynorhinus mexicanus*? Y de ser así, ¿Cuáles son las posibles relaciones entre la expresión de estas proteínas con la maduración espermática epididimaria de esta especie animal?

Hipótesis

La expresión de las proteínas CRISP 1, ADAM7 y la bomba de calcio PMCA4 en el tejido epididimario de *C. mexicanus*, será mayor en la etapa de la maduración espermática epididimaria en esta especie de murciélago.

Objetivo General

Asociar la expresión de CRISP 1, ADAM7 y PMCA4 en epidídimo con su posible participación en la maduración espermática epididimaria de *Corynorhinus mexicanus*.

Objetivos particulares

Establecer la homología de las proteínas CRISP1, ADAM7 y PMCA4 de *C. mexicanus*, a través del grupo quiróptera.

Observar las regiones y etapas de expresión de CRISP 1, PMCA4 y ADAM7 en el epidídimo del murciélago *C. mexicanus*.

Material y métodos

Obtención de los ejemplares

Se realizó la colecta de tres ejemplares de *C. mexicanus* de los meses de octubre; periodo en el que se considera se lleva a cabo la maduración, y febrero; considerado como la parte final del periodo de almacenamiento de los espermatozoides en la cola del epidídimo. Como criterios de inclusión de los especímenes de estudio como adultos se consideró: el desgaste alar, la osificación en de la cuarta articulación metacarpiano-falange y evidencia de espermatozoides en el epidídimo,

observándose bulboso y con coloración blanca (León-Galván *et al.*, 2005; Arenas-Ríos *et al.*, 2005; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2016).

Obtención de los epidídimos y testículos

Los ejemplares previamente capturados fueron trasladados al laboratorio de morfofisiología y bioquímica del espermatozoide en la Universidad Autónoma Metropolitana. El manejo de los animales se realizó de acuerdo con las normas establecidas por Sikes y Gannon (2011), el procesamiento del material biológico y uso del material químico en laboratorio se realizó de acuerdo con Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-I (Román, 2010). La eutanasia se realizó por decapitación, posteriormente se aislaron los testículos y epidídimos. Los epidídimos fueron separados en sus tres regiones mayores *caput*, *corpus* y *cauda*. Cada una de las regiones del epidídimo y testículos fueron fijados en PAF 4% y posteriormente almacenados en alcohol al 70% hasta su preparación histológica.

Procesamiento histológico

Las regiones del epidídimo y testículos almacenados fueron deshidratados con alcohol (OH) pasando de OH-70% a OH-80% continuando hasta OH-100% para dar paso al aclaramiento del tejido con Xileno para finalmente ser incluidas en parafina. Posteriormente, se realizaron 6 cortes de 5 μm de cada región del epidídimo y de los testículos con un microtomo de rotación, las muestras fueron finalmente montadas en un portaobjetos recubierto con adhesivo tisular (Martínez *et al.*, 2012).

Identificación por inmunohistoquímica de CRISP1, ADAM7, PMCA4 en epidídimo de *C. mexicanus*.

Se realizó la desparafinación de las muestras tanto de testículo como de las tres regiones del epidídimo. Para ello, se hizo un secado de las muestras en parafina a 56°C, se continuó con dos lavados en xileno por 5 minutos con agitación suave. Posteriormente, se hicieron lavados con etanol al 100% por 3 minutos cada lavado, se continuó con varios lavados a diferentes concentraciones decrecientes de etanol de 96%, 90% hasta 70%. Subsecuentemente, se lavaron las muestras con agua

destilada durante 5 minutos. Para la recuperación del antígeno las muestras se sumergieron en citrato de sodio (0.01M pH6) y se calentaron a 80°C durante 20 min (Buchwalow & Böcker, 2010).

Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se sumergieron en PBS-Tween durante 10 min para permeabilizar la membrana, se continuo con un lavado con PBS para pasar al bloqueo de sitios inespecificos con BSA (5%) por dos horas. Se quitó el exceso de albúmina con PBS-Tween y se procedió a la incubación con anticuerpos policlonales primarios Anti-CRISP1 de conejo (1:500; Sigma-Aldrich, HPA030534-100UL), Anti-ADAM7 de conejo (1:200; Santa Cruz Biotechnology, SC-25137) y Anti-PMCA4 de ratón (1:500; GeneTex, GTX22783) durante 24 hrs. Se realizaron dos lavados por 3 minutos con PBS y se continuó con la incubación con anticuerpos secundarios IgG Anti-conejo (Sigma-Aldrich, SAB4600234) y Anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology, SC-516606) conjugados con Alexa Flour 488. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS para que las muestras fueran montadas en PBS-glicerol (1:1) y visualizarlas mediante microscopía de fluorescencia (Buchwalow & Böcker, 2010).

Como control negativo se realizaron incubaciones solo con anticuerpos secundarios e inmunohistoquímica en testículos, ya que estas proteínas se expresan solo en el epidídimo. Se realizó el análisis de imágenes mediante el software ImageJ.

Análisis filogenético

Con la finalidad de tener la certeza del reconocimiento de las proteínas por parte de los anticuerpos en el tejido epididimario de *C. mexicanus* y conocer su ortología con otros grupos de animales. Se realizó un blast para la obtención de las secuencias de las proteínas de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 de diferentes vertebrados (mamíferos, reptiles y aves) tomando como referencia para la búsqueda los epítomos de los anticuerpos primarios anti-CRISP1 (P54107.1), -ADAM7 (AAC5336.1), y -PMCA4 (P23634).

Las secuencias se obtuvieron del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para el alineamiento, selección del modelo

evolutivo y construcción de las filogenias se utilizó el software MEGA7 (<https://www.megasoftware.net>).

Una vez obtenidas las secuencias se realizó un alineamiento con MUSCLE, para dar paso a la selección del modelo evolutivo, la selección del modelo se estimó a través del criterio de información de Akaike (AIC) que permite la comparación entre varios modelos anidados o no anidados de manera simultánea, además de evaluar la incertidumbre de la selección del modelo para estimar la filogenia y los parámetros de un modelo (Posada & Buckley, 2004). El mejor modelo que se ajustó a las secuencias de las tres proteínas fue el de Jones-Taylor-Thornton (JTT). Este modelo asume que las diferencias en la frecuencia de aminoácidos con tasas de sustitución son diferentes (Choudhuri, 2014). Sumado al modelo para la reconstrucción filogenética, se utilizó la estimación de sitios invariables (+I); que establece sitios de aminoácidos que no varían y son resistentes a cambios, ya que, dichos cambios pueden ser fatales o deletéreos en estos sitios (Jia *et al.*, 2014), y la distribución gamma (+G); que asume que las tasas de sustitución entre sitios varían con un número fijo de categorías, por lo que el modelo contempla sitios que evolucionan más rápido que otros (Sheffield, 2013). En resumen, CRISP1 y PMCA4 fue analizado por JTT+I+G y ADAM7 por JTT+G.

Finalmente, se realizó la construcción de las filogenias con MEGA7 (<https://www.megasoftware.net>). Utilizando el método de inferencia filogenética Maximum Likelihood (ML = máxima verosimilitud). El soporte de las ramas se evaluó por SH-aLRT (prueba de razón de probabilidad aproximada [aLRT] y Shimodaira-Hasegawa [SH] -aLRT) para la obtención del grado de fiabilidad de que la construcción de la rama observada es la más acertada.

Análisis Estadístico

Se compararon los datos obtenidos de las imágenes por inmunofluorescencia, indicativo de los niveles de expresión de CRISP 1, ADAM7 y PMCA4 en epidídimo, entre los meses de octubre y febrero del muestreo para epidídimo, entre cada una de las regiones del epidídimo y entre cada mes para cada una de las regiones del epidídimo.

La prueba de Kolmogórov-Smirnov y la prueba de Levene determino que nuestros datos presentaron una distribución no normal y heterocedasticidad, respectivamente, en ambas pruebas se consideró una $p > 0.05$. Por lo tanto, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis observándose diferencias significativas entre las medianas de los niveles de expresión de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 para cada uno de los grupos, por lo que se realizó una prueba *post hoc* de Dunn. Se consideró una $p < 0.05$ para determinar diferencias estadísticas significativas.

Resultados y Discusión

La presencia de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 en epidídimo de *C. mexicanus* nos va a brindar información sobre los posibles mecanismos involucrados en la preparación fisiológica y bioquímica de los espermatozoides durante su maduración, que se extiende hasta la región caudal en esta especie, así como la regulación del ambiente luminal epididimario que permiten al espermatozoide mantener un estado quiescente durante tanto tiempo, sin afectar la viabilidad, propiciada por la capacidad multifuncional de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 durante los procesos de maduración y posterior fecundación.

En la actualidad no se cuenta con el genoma secuenciado de *C. mexicanus*, esto dificulta la creación de anticuerpos específicos para el reconocimiento de proteínas específicas en esta especie.

Por lo tanto, los análisis filogénicos nos ayudan a inferir la posibilidad de la presencia de proteínas homologas de interés en nuestro modelo de estudio, para posteriormente realizar los experimentos que sustenten esta inferencia.

Los análisis filogenéticos permiten detectar miembros de familias de proteínas en diferentes organismos al comparar las secuencias de alguna proteína de interés con otras secuencias similares, para lo cual, se usan bases de datos con las premisas de que todas las proteínas derivan de una proteína ancestral en común por eventos de especiación y duplicación (Gabaldon, 2005).

En el análisis filogenético realizado se encontró que CRISP1 y 4 de roedores están más estrechamente relacionadas con CRISP1 de humano (fig. 1; Anexo 1). Por otra

parte, CRISP1 de quirópteros es el taxón hermano de roedores y primates, esto presupone que CRISP1 de quirópteros sea el ortólogo de CRISP1 humano y CRISP1 de roedores (Gibbs *et al.*, 2008). Nuestra filogenia respalda la estrecha relación existente entre las CRISPs de mamíferos con las CRISPs de reptiles, dando muestra de que las CRISPs de ambas clases derivan de un ancestro común (Vicens & Treviño, 2018).

La filogenia de los tres miembros CRISP (1-3) presentes en quirópteros (tomando como referencia la secuencia de *Myotis licifugus*) junto con CRISP4 de roedores se separaron en dos grandes grupos CRISP2/3 y CRISP1/4 de roedor, en ambas filogenias no se encontró la presencia de CRISP4 en quirópteros, por lo que CRISP1 de quirópteros sería el ortólogo de CRISP4 de roedores (fig. 1B) como se ha descrito para CRISP1 de humano (Hu *et al.*, 2018). Es probable que CRISP1 de quirópteros al igual que CRISP1 de humano, cumpla las funciones duales de CRISP1 y CRISP4 en roedores (Hu *et al.*, 2018; Weigel-Muñoz *et al.*, 2019), razón por la cual, la identificación de CRISP4 se excluyó del presente estudio.

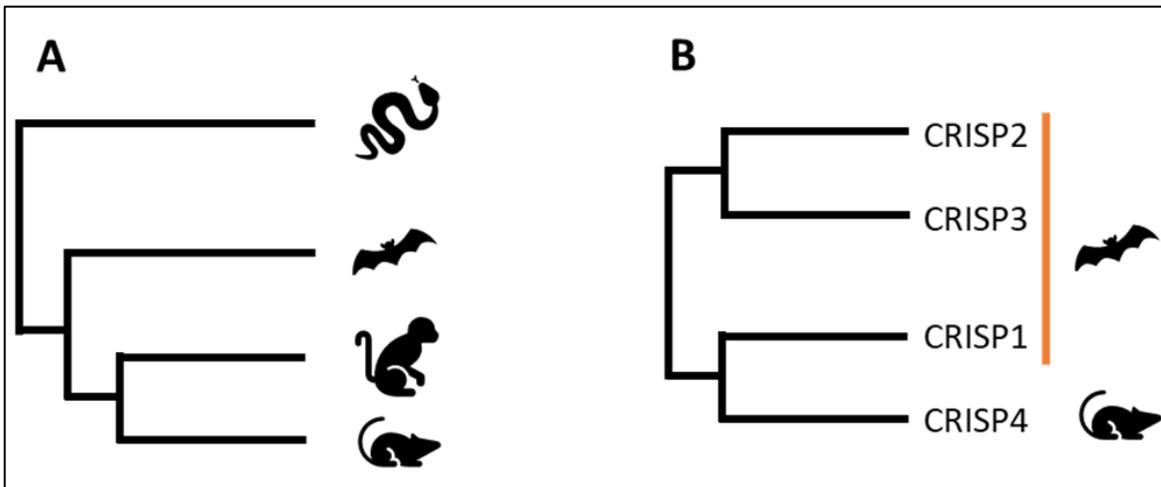


Fig. 1 Filogenia de CRISP en diferentes vertebrados. A) CRISP1 de diferentes vertebrados y CRISP4 de roedores, obsérvese la formación de un grupo grande conformado por quirópteros, primates y roedores; B) CRISP (1-3) presentes en quirópteros junto con CRISP4 de roedores, obsérvese la formación de dos grupos CRISP2/3 de quirópteros y CRISP1 de quirópteros/CRISP4 de roedor.

Nuestro análisis filogenético sobre la bomba de calcio muestra que la PMCA4 presente en quirópteros se encuentra emparentada con PMCA4 de roedores (fig. 2A; Anexo 3), en donde se ha identificado su presencia en los espermatozoides

para mantener el $[Ca^{2+}]_i$ adecuado para una fecundación exitosa (Choi, *et al.*, 2015). Por otro lado, PMCA4 de mamíferos es ortólogo de PMCA4 de aves cuya función también está involucrada en el mantenimiento adecuado del $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide principalmente para la movilidad (Setiawan, *et al.*, 2019), lo cual habla de funciones conservadas.

En el caso de ADAM7 de quirópteros está estrechamente relacionado con ADAM7 de equinos (fig. 2B; Anexo 4), mientras que ADAM7 de roedores está más relacionado con ADAM de reptiles. El Blast realizado para obtener secuencias de ADAM7 en reptiles arrojó principalmente miembros del orden Testudines que resultó ser el grupo más emparentado con ADAM7 de roedores. Estudios anteriores muestran que el ancestro de ADAM7 es la metaloproteinasa ADAMDEC1 (Bates *et al.*, 2002), la cual está estrechamente relacionada con las metaloproteinasas del veneno de serpiente (SVMP), por lo que se considera que ADAM7 y las SVMP derivan de un ancestro común (Casewell, 2012) y, por tanto, las funciones podrían ser similares, pero para objetivos diferentes, como sucede entre las CRISP de mamíferos con respecto a las CRISP de reptiles.

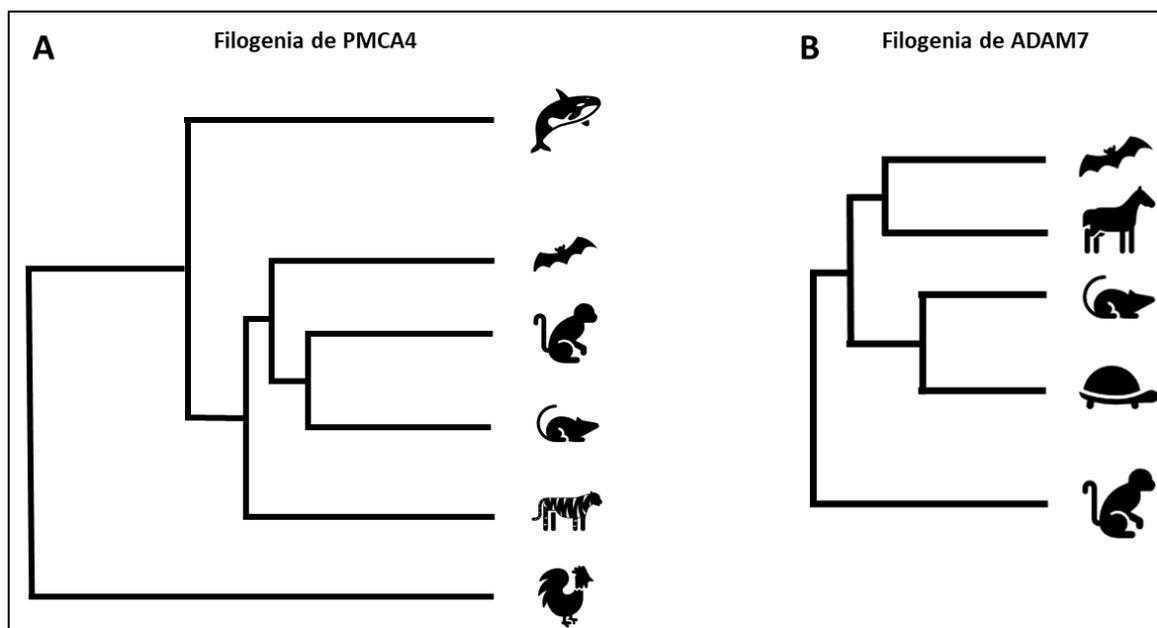


Fig. 2 Filogenia de PMCA4 y ADAM7 en diferentes vertebrados. A) La Filogenia de PMCA4 muestra que PMCA4 de quirópteros está emparentado con el grupo de primates y roedores. B) La Filogenia de ADAM7 muestra que ADAM7 de quirópteros está más emparentado con los equinos y su grupo hermano son el grupo conformado por roedores y reptiles.

Tomando la filogenia como punto de partida sobre la presencia de las diferentes proteínas (CRISP1, ADAM7 y PMCA4) en tejido de *C. mexicanus*, se continuó con los trabajos de inmunohistoquímica para determinar el patrón de expresión de estas proteínas en el túbulo epididimario desde el inicio de la maduración de los espermatozoides (octubre) hasta la última fecha de almacenamiento en la *cauda* (febrero). Nuestros resultados indican que CRISP1 se expresa de manera uniforme en todo el epidídimo durante la maduración de los espermatozoides, sin presentar diferencias significativas entre las distintas regiones (Fig. 3A y 4).

Se ha descrito que CRISP1 se adquiere en los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo; presenta un papel como factor decapacitante durante la maduración epididimaria (Cohen *et al.*, 2000a;b). Particularmente, la forma D de CRISP1 se localiza en la región dorsal del acrosoma del espermatozoide de ratón (Cohen *et al.*, 2000a), que se une de manera transitoria hasta ser liberada durante la capacitación (Roberts *et al.*, 2008). La unión de esta proteína con el espermatozoide es temporal, por tanto, se considera que es la encargada de evitar la capacitación de los espermatozoides durante su almacenamiento en la región caudal del epidídimo (Roberts *et al.*, 2003, Roberts *et al.*, 2008). Esto resulta interesante, ya que en *C. mexicanus* el proceso de maduración de los espermatozoides culmina en la región caudal.

Si bien la proteína no se detectó en espermatozoides de *C. mexicanus*, muy probablemente esta sea adquirida por el mismo, como sucede para otras especies (Roberts *et al.*, 2002). Por lo tanto, podríamos inferir que CRISP1 en espermatozoides este impidiendo el ingreso de Ca^{2+} al estar inhibiendo CatSper y TRPM8, como se ha visto con CRISP2, el cual puede anclarse a la subunidad CATSPER1 y de esta manera ejercer su función sobre el canal (Lim *et al.*, 2019), además de que, ambas proteínas parecen tener un papel complementario e individual en la adquisición de la movilidad progresiva, ya que los espermatozoides knockout de CRISP1, CRISP4 y/o doble knockout muestran una movilidad progresiva disminuida y alteraciones en sus patrones de movimiento, observándose espermatozoides estáticos, lentos, o con una movilidad acelerada, muestra de un

papel compartido e individual de CRISP1 y CRISP4 (Hu *et al.*, 2018; Carvajal *et al.*, 2018).

Por lo tanto, es posible que CRISP1 y 4 regulen el flujo Ca^{2+} extra e intracelular en el espermatozoide a través de los canales CatSper y TRPM8 (De Blas *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2017) permitiendo la adquisición de la movilidad progresiva (Dacheux *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2017). La movilidad en este caso podría estar mediada por la tirosina quinasa FER (Grinshtaina *et al.*, 2022) cuya actividad permite la P-Tyr asociada a la capacitación (Alvau *et al.*, 2016), donde recientemente se ha reportado participa en la adquisición de la movilidad progresiva e hiperactivada de los espermatozoides, inclusive con la protección de la reacción acrosomal espontánea (Grinshtaina *et al.*, 2022). Aspectos en los que CRISP1 participa (Hu *et al.*, 2018).

En el caso de PMCA4 y ADAM7, se observó un mayor marcaje a nivel de la región *caudal vs caput* y *corpus* del epidídimo, respectivamente (Fig. 3B y 3C). Se puede notar que en *corpus* y *cauda* es más definida la presencia de las proteínas en las células epiteliales epididimarias (fig. 4). En el caso del *caput* el diámetro de los túbulos es menor, razón por la que se observó una menor expresión (Fig. 4).

El calcio y las señales dependientes de Ca^{2+} son indispensables en el mantenimiento de los procesos durante la maduración y fertilización de los espermatozoides. Se ha descrito que PMCA4 es esencial para mantener una baja concentración de Ca^{2+} en los espermatozoides de ratón (Patel *et al.*, 2013), ya que, la contribución de NCX, MICU y SERCA son mínimas (Wennemuth *et al.*, 2003). Por lo tanto, es fundamental el papel de PMCA4 en la regulación de la función espermática sobre los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Brandenburger *et al.*, 2011). En *C. mexicanus* los espermatozoides ingresan al epidídimo dos meses antes (septiembre) de que las hembras sean receptivas (noviembre), razón por la que no se espera encontrar espermatozoides maduros en este momento. Las concentraciones de iones calcio deben estar cuidadosamente reguladas en el interior del epidídimo para no propiciar una maduración prematura de los espermatozoides. Además, aun cuando los gametos sean inseminados en el tracto

genital de la hembra serán almacenados tres meses más hasta la liberación del ovocito (León-Galván *et al.*, 2005).

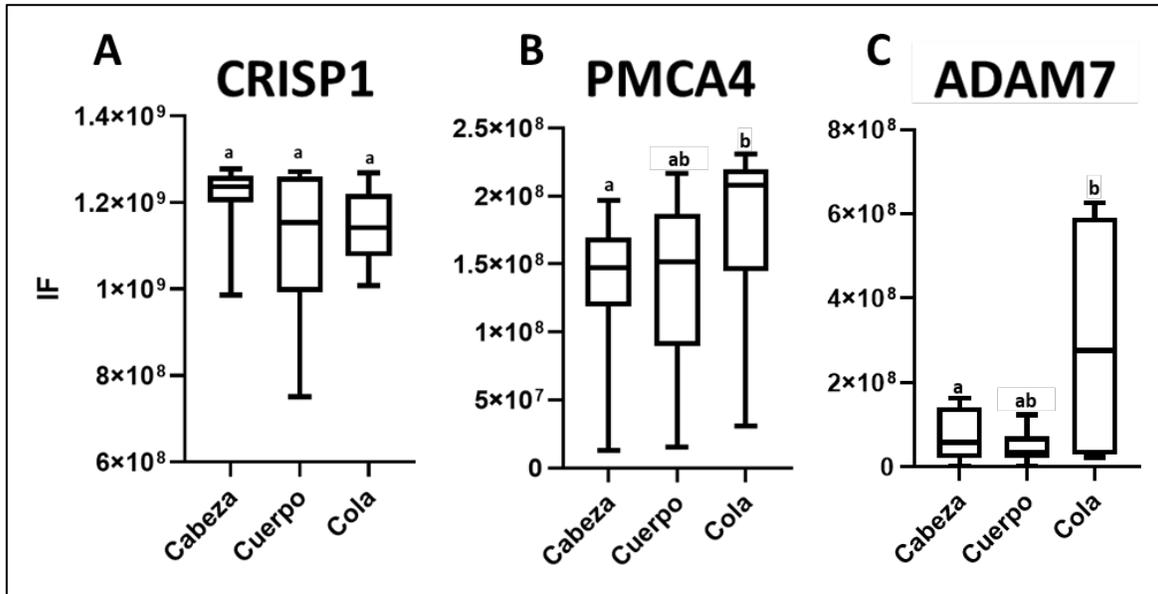


Fig. 3 índice de fluorescencia de CRISP1, PMCA4 y ADAM7 en tejido epididimario de *C. mexicanus* durante el periodo de maduración de los espermatozoides (mes de octubre). A) IF CRISP1; B) IF PMCA4 y; C) IF ADAM7. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo, cola). Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunn. Se tomo una $n=3$.

De este modo, la acción en conjunto de PMCA4 y CRISP1, puede relacionarse con la propuesta de una capacitación retardada que hicieron Uchida *et al.* (1988), en dónde se consideran aplazados los eventos fisiológicos y bioquímicos propios de la capacitación que ocurre en el murciélago *Pipistrellus abramus*, en los que la activación y desarrollo de los óvulos incrementó en el momento que los espermatozoides se almacenaron por un periodo prolongado en el tracto reproductor femenino (Uchida *et al.*, 1988), además, en hembras de *Myotis lucifugus* se ha reportado que, la capacitación es dependiente de la temperatura (Lambert, 1981). Lambert (1981) demostró que los espermatozoides de *Myotis lucifugus* almacenados a 4°C por 24 hr que fueron re-incubados a 32°C por 30 min mostraron un incremento en movilidad y una mayor tasa de fecundación de óvulos de hámster libres de zona pelúcida, destacando que posteriormente al periodo de hibernación de las hembras *M. lucifugus* y al incremento en la temperatura corporal, la capacitación puede llevarse a cabo.

Por lo anterior, es factible que en el caso de *C. mexicanus* exista un retraso en los eventos fisiológicos y bioquímicos que favorecen la maduración de los espermatozoides, propiciando que este proceso culmine en la cauda del epidídimo (Rodríguez-Tobón *et al.*, 2016). También, se debe tomar en consideración que *C. mexicanus* es una especie de murciélago que no hiberna estrictamente, sino que presenta torpór diario, estado fisiológico que reduce el metabolismo al mínimo, pero de manera intermitente, ya que, el animal se reactiva periódicamente para forrajear o alimentarse (León-Galván *et al.*, 2005). Por tanto, este cambio de temperatura corporal diario (37°C a 8°C) (León-Galván *et al.*, datos no publicados) podría estar provocando alteraciones en el flujo de calcio en el interior de los espermatozoides, esto si consideramos que los niveles séricos de calcio disminuyen durante la hibernación como se ha observado en *M. lucifugus* e influyan en los niveles de calcio presentes en el ambiente luminal y del espermatozoide (Riedesel & Folk, 1958) como se ha observado en peces cuyos cambios de temperatura corporal provocan cambios en los flujos del $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides (Dadras *et al.*, 2019)

En conjunto, la acción inhibitoria de CRISP1 sobre CatSper y el eflujo de Calcio por parte de PMCA4, estarían favoreciendo el retraso de la maduración de los espermatozoides, fenómeno que se vería reflejado en los espermatozoides de la región caudal del epidídimo, que exhiben un mayor porcentaje de movilidad con respecto a los espermatozoides obtenidos del *corpus* del epidídimo (Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015). A su vez, el estado fisiológico en que se encuentran los espermatozoides epididimarios fortalece la idea de una capacitación retardada, además de que en las hembras de *C. mexicanus* los espermatozoides también son almacenados durante un periodo de tiempo prolongado en el tracto reproductor femenino (3 meses) antes de su encuentro con el ovocito, ya que se presenta una adaptación reproductiva conocida como ovulación postergada (León-Galvan *et al.*, 1999).

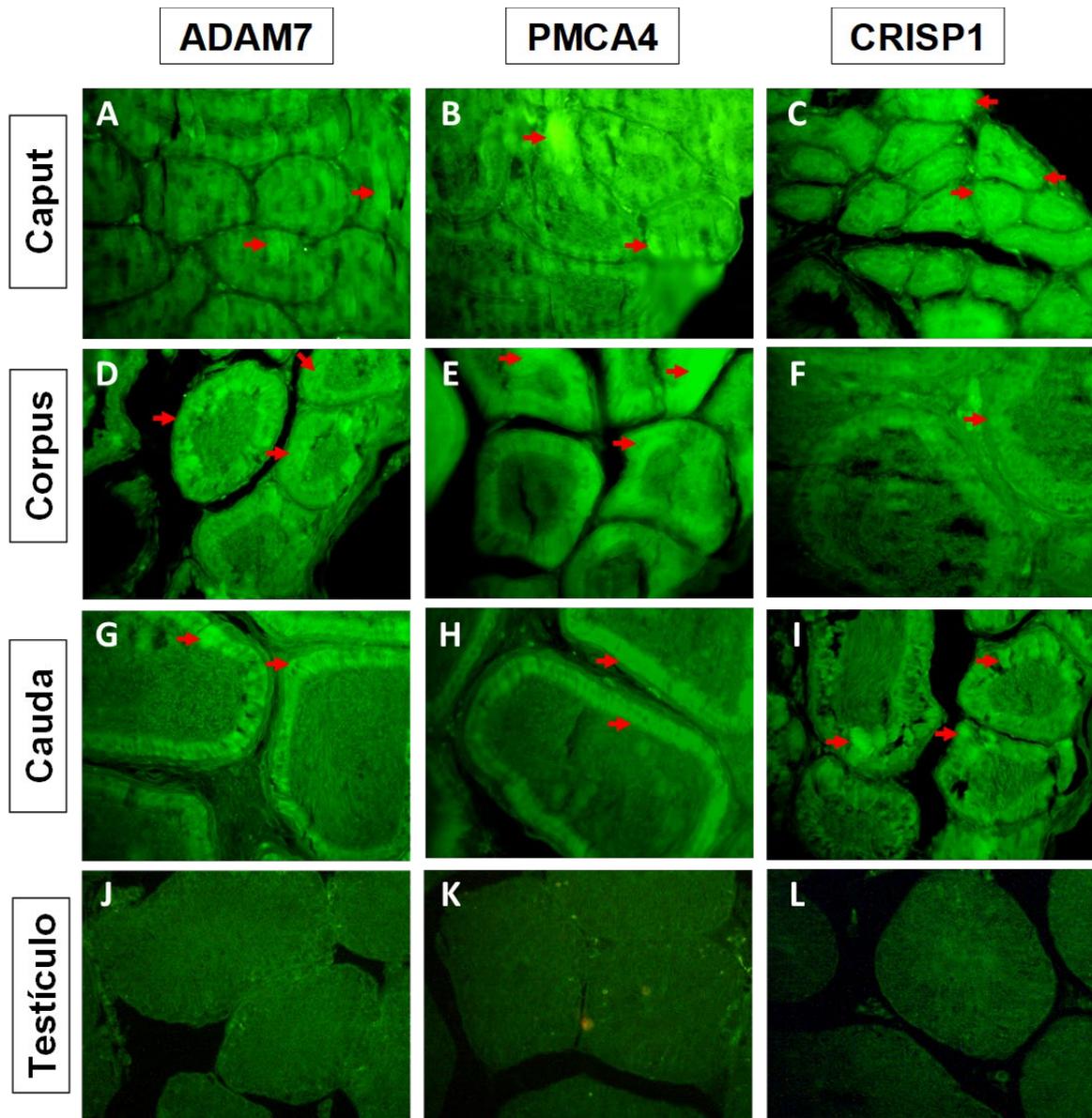


Fig. 4 Inmunolocalización de ADAM7, PMCA4 y CRISP1 en tejido epididimario de *C. mexicanus* durante el periodo de maduración de los espermatozoides (octubre). A, D, G) ADAM7; B, E, K) PMCA4 y C, F, I) CRISP1. J, K, L) micrografías de testículo de *C. mexicanus* como control negativo. Micrografías 40x. n=3.

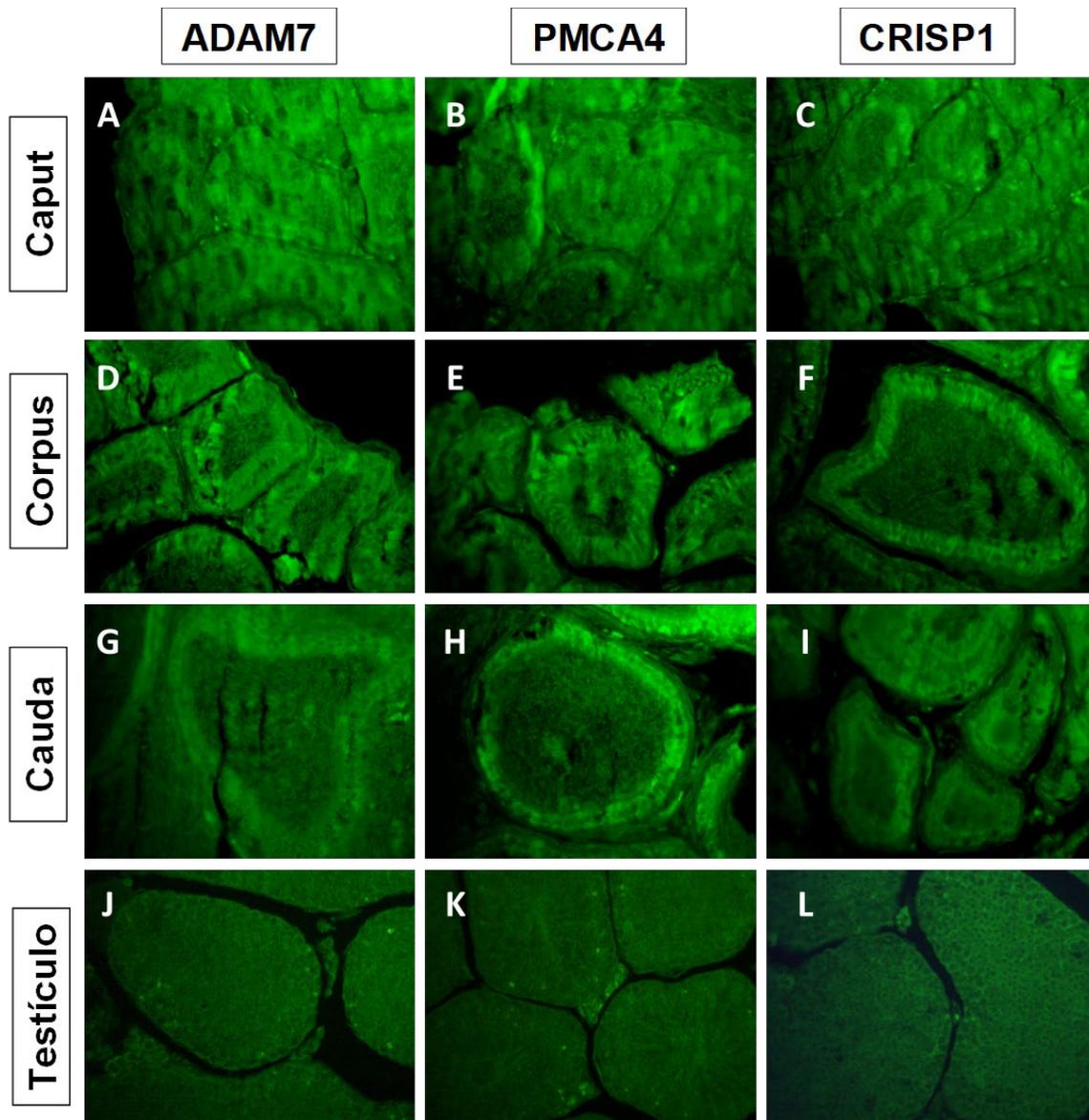


Fig. 5 Inmunohistoquímica solo con anticuerpo secundario en tejido epididimario de *C. mexicanus* como controles para A,D,G) ADAM7; B, E, K) PMCA4 y C, F, I) CRISP1. J, K, L) durante el periodo de maduración de los espermatozoides (octubre). Micrografías 40x n=3.

La expresión de ADAM7 se observó en todo el epidídimo de *C. mexicanus* (fig. 3C y 4), así como se ha observado en murinos y humanos (Cornwall *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). En la figura 3C podemos notar que la expresión se incrementó hacia la región caudal. Estudios histológicos tanto en animales silvestres como nulos para ADAM7 revelan el requerimiento de esta proteína en el mantenimiento de la integridad celular que conforma el túbulo epididimario. Se ha determinado que en el tejido epitelial epididimario de ratones nulos para ADAM7, la

altura de las células epiteliales se reduce drásticamente. La circunferencia de la luz del túbulo aumenta en comparación con ratones silvestres. En ocasiones, se encuentran granulomas espermáticos y mineralización en el *caput* del epidídimo de ratones nulos. Además de hiperplasia y vacuolizaciones en la *cauda* del epidídimo (Choi *et al.*, 2015).

El tiempo que pasan los espermatozoides almacenados en la cauda del epidídimo de *C. mexicanus* es de aproximadamente cinco meses, por lo que, su estructura celular y en conjunto del tejido, debe mantenerse íntegra durante este prolongado tiempo de almacenamiento. Por lo que ADAM7 podría estar involucrado en la regulación negativa de los procesos secretorios apocrinos en el *caput* por un mecanismo aún no descrito. En este caso, la ausencia de ADAM7 podría causar actividad secretora excesiva, que conduce a la alteración de la organización del epidídimo, órgano que se encarga de mantener el microambiente luminal adecuado para los espermatozoides. Defectos en el epitelio del epidídimo provocan cambios en la composición del microambiente, que impedirían una correcta maduración de los espermatozoides (Choi *et al.*, 2015).

Choi *et al.* (2015) reportaron que, espermatozoides nulos de ADAM7 presentaban colas anguladas (zig-zag) en los espermatozoides cuando estos se encuentran en el útero de las hembras. La presencia de ADAM7 es más evidente en la cola de los espermatozoides que en su cabeza, se considera que la ausencia de esta proteína genera deformaciones estructurales, lo cual se puede asociar a que ADAM7 está relacionado con la capacidad de los espermatozoides de regular su osmolaridad, pues dicha deformación se ha observado de manera muy similar en espermatozoides nulos para acuaporina 3, esto indica defectos en la regulación osmolar por parte de las proteínas cuando se enfrentan a un cambio osmolar en el epidídimo (415 mOsm) o en el útero (315 mOsm) (Chen *et al.*, 2011).

En espermatozoides obtenidos del *caput* del epidídimo de hámster expuestos a 290 mOsm, Serres y Kann (1984) observaron una baja movilidad y angulación del flagelo, posteriormente en un medio de 400 mOsm, los espermatozoides del *caput*

no mostraron angulación, esto es muestra de la respuesta osmótica por parte de los espermatozoides durante su maduración.

La interrupción en la organización del epitelio del *caput* en ratones nulos para ADAM7 resultó en reducción de la movilidad de los espermatozoides y un cambio en la P-Tyr de las proteínas espermáticas. Uno de los principales cambios celulares durante la capacitación espermática es el incremento en la P-Tyr en la cola de los espermatozoides. Sin embargo, no existen estudios que demuestren la subyacente relación entre ADAM7 y la fosforilación de tirosinas. Posiblemente, ADAM7 está involucrado en la regulación de las proteínas de la membrana espermática que activan la vía de fosforilación de tirosina en espermatozoides (Choi *et al.*, 2015).

En *Myotis lucifugus* se han reportado niveles hiperosmolares en la *cauda* del epidídimo (1523 mOsm) que corresponden al periodo de almacenamiento espermático durante la hibernación, posteriormente la osmolaridad baja a 410 mOsm al final del periodo de almacenamiento, demostrando que, un estado hiperosmolar permite a los espermatozoides entrar en un estado quiescente durante su almacenamiento en la *cauda* durante la hibernación (Crichton *et al.*, 1994). Aspecto que debe ser estudiado con más detalle, puesto que en *C. mexicanus* el macho presenta torpor diario (Rodríguez-Tobón, 2016), por lo cual, el mecanismo de almacenamiento de los espermatozoides debe ser diferente.

Es probable que los niveles osmolares también sean altos, pero no lo suficientes como para dejar al espermatozoide en un estado quiescente, sino más bien provocar un retraso en los procesos implicados en la de maduración espermática, por ejemplo, en *Pipistrellus abramus* se ha observado que, entre más tiempo pasen los espermatozoides almacenados (150-166 días) en el tracto reproductor femenino mayor es el número de óvulos activados, esto parece indicar un retraso en los eventos fisiológicos propios de la capacitación (Uchida *et al.*, 1988). Este fenómeno podría estar relacionado con la maduración en el epidídimo de *C. mexicanus* provocando la extensión en tiempo y región de término de la maduración, asociada al almacenamiento prolongado, inclusive, en hembras de *C. mexicanus* se ha sugerido un periodo de almacenamiento prolongado para lograr que se capaciten

los espermatozoides en el tracto genital de la hembra (Martínez *et al.*, 2021) ya que la ovulación y fertilización al momento de las copulas en noviembre no se lleva a cabo y se posterga hasta finales de enero (Rodríguez-Tobón, 2016). Sin embargo, son necesarios más estudios sobre las funciones bioquímicas y fisiológicas de ADAM7 sobre el espermatozoide, ya que las deformaciones en espermatozoides nulos de ADAM7 no necesariamente pueden estar relacionados con las repuestas osmolares por parte del espermatozoide.

Con la intención de conocer la expresión de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 y su posible participación durante la última fecha en la que encontramos espermatozoides almacenados en la *cauda* del epidídimo de *C. mexicanus*, se realizaron las pruebas inmunohistoquímicas correspondientes para el mes de febrero. Encontrando que, no hay diferencias significativas en el IF entre las diferentes regiones del epidídimo para cada una de las proteínas (fig. 6). Las micrografías muestran una tinción homogénea para cada una de las regiones (fig. 7). La *cauda* es la única región del epidídimo que no se encuentra con regresión, observándose muy bien las células del tejido y la presencia de espermatozoides en el lumen.

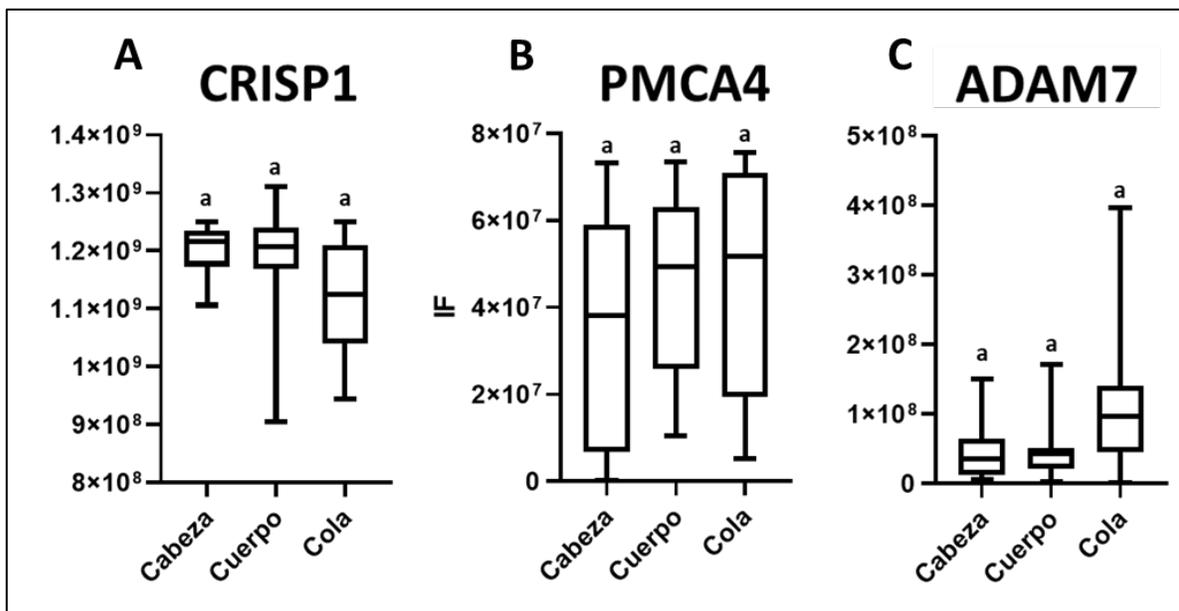


Fig. 6 índice de fluorescencia de CRISP1, PMCA4 y ADAM7 en tejido epididimario de *C. mexicanus* durante el periodo de almacenamiento de los espermatozoides (mes de febrero). A) IF CRISP1; B) IF PMCA4 y; C) IF ADAM7. No se observan diferencias significativas entre regiones del epidídimo

(cabeza, cuerpo, cola). Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunn. Se tomo una $n=3$.

Es importante entender cómo el epidídimo provee el ambiente necesario para el mantenimiento de los espermatozoides, síntesis y secreción de proteínas, concentración y liberación ideal de iones, generación del ambiente redox necesario, entre otros factores, todo en conjunto, mantendrá a los espermatozoides en las condiciones ideales hasta el momento de la eyaculación. Sin embargo, en la mayoría de los mamíferos, los gametos que cruzan la región distal del *corpus* del epidídimo se consideran maduros, condición fisiológica que les permitirá capacitarse una vez que ingresen en el aparato genital femenino.

Este aspecto es de suma importancia en *C. mexicanus*, debido a que las células serán mantenidas desde septiembre (ingreso de los espermatozoides al epidídimo) hasta el término del periodo de cópulas (diciembre). Los mecanismos para brindar las condiciones necesarias para el mantenimiento de los gametos deben ser logrados y mantenidos durante varios meses. Especies que presentan un patrón de reproducción continuo o estacional sincrónico no almacenan los espermatozoides por meses en el epidídimo, por lo que conocemos sobre la maduración de los espermatozoides no se apega a lo que está sucediendo en *C. mexicanus*, el cual presenta un patrón de reproducción estacional asincrónico, esto implica que la producción de espermatozoides ocurre en verano y los apareamiento en otoño, por lo que los gametos masculinos serán almacenados varios meses hasta los apareamientos.

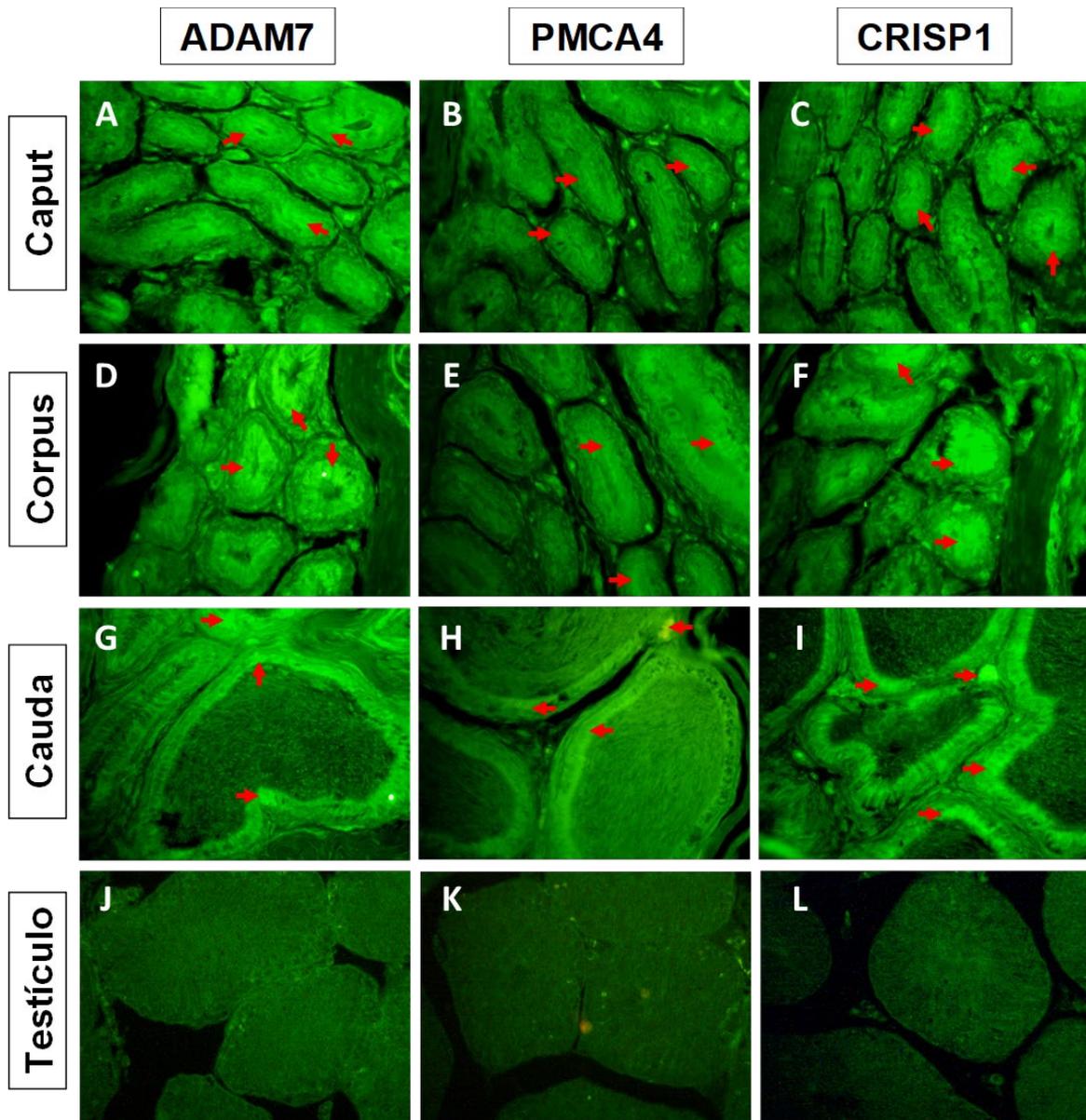


Fig. 7 Inmunolocalización de ADAM7, PMCA4 y CRISP1 en tejido epididimario de *C. mexicanus* durante la parte final del periodo de almacenamiento de los espermatozoides (febrero). A, D, G) ADAM7; B, E, K) PMCA4 y C, F, I) CRISP1. J, K, L) micrografías de testículo de *C. mexicanus* como control negativo. micrografías 40x. n=3. Los controles con anticuerpo secundario se encuentran en el anexo 6.

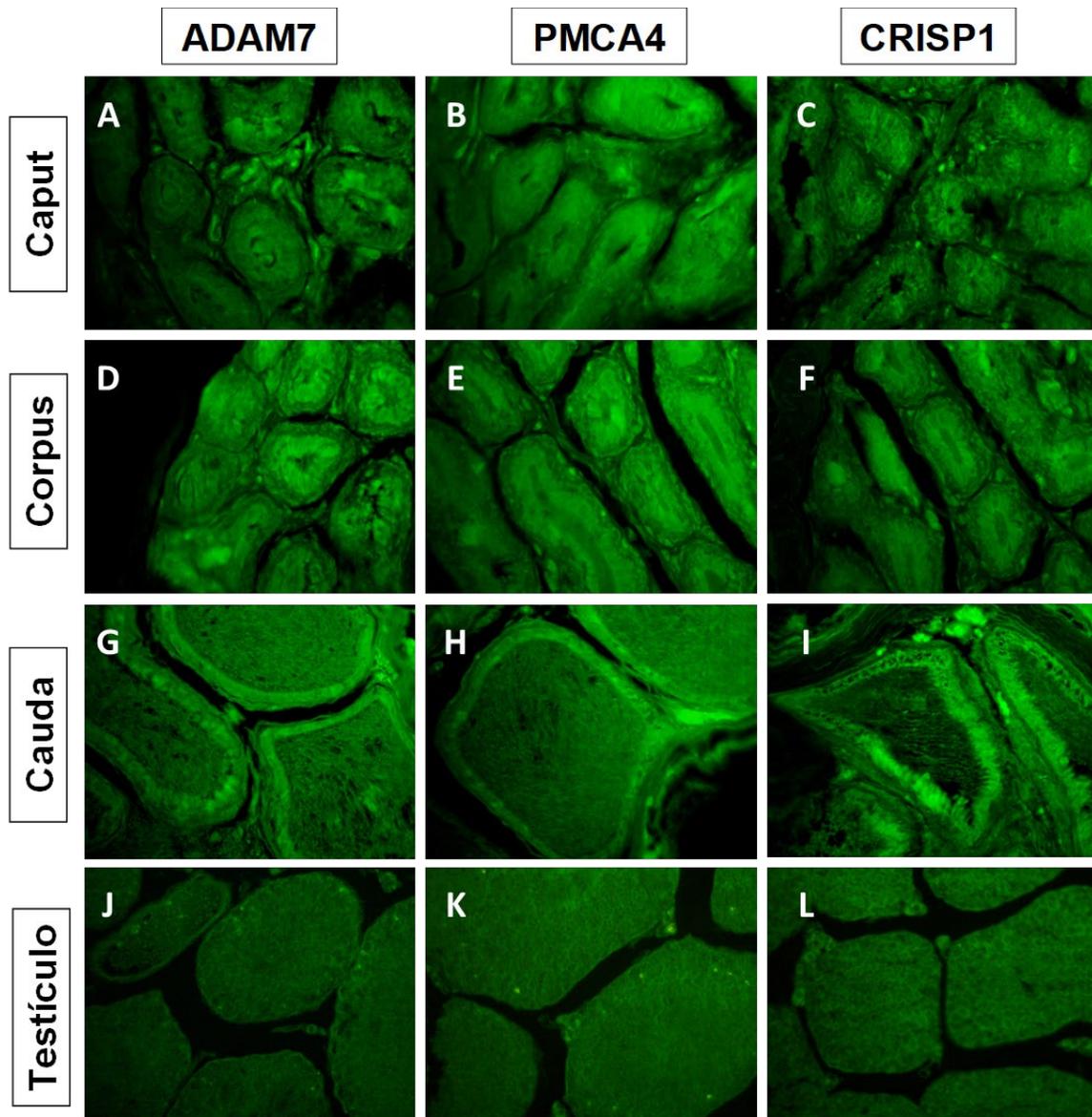


Fig. 8 Inmunohistoquímica solo con anticuerpo secundario en tejido epididimario de *C. mexicanus* como controles para A,D,G) ADAM7; B, E, K) PMCA4 y C, F, I) CRISP1. J, K, L) durante el periodo de maduración de los espermatozoides (octubre). Micrografías 40x n=3.

La producción o síntesis de proteínas y generación del ambiente luminal adecuado en especies con reproducción continua como en especies estacionales sincrónicas es constante durante algunos meses o todo el año, respectivamente. En *C. mexicanus*, la mayor actividad del epidídimo comenzaría en el momento que los espermatozoides ingresan a este órgano, similar a lo que estaría pasando en una especie estacional, sin embargo, el epidídimo es un órgano andrógeno dependiente, y en esta especie el testículo involuciona completamente en el mes de octubre

(León-Galván *et al.*, 2005). Esto implica que la síntesis de proteínas por parte de los diferentes tipos celulares que conforman el túbulo epididimario esta extraordinariamente ajustado a las concentraciones de testosterona existentes, las cuales se esperaba fueran mantenidas hasta el término de los apareamientos, en cambio encontramos espermatozoides completamente viables y móviles en el mes de febrero (Arenas-Ríos *et al.*, 2007).

Lo anterior indica que existen las proteínas y el microambiente necesario para mantener a los gametos en completo funcionamiento durante ~5 meses (León-Galván *et al.*, 2005; Arenas-Ríos *et al.*, 2007).

Como se observa en la figura 5, la expresión de CRISP1, ADAM7 y PMCA4 es similar aún después del término del periodo de apareamientos, esto seguramente para mantener integras las células que conforman el túbulo durante el periodo de almacenamiento (Hu *et al.*, 2018; Carvajal *et al.*, 2018).

Dicha integridad del tejido permitirá la interacción adecuada de célula-célula, el procesamiento de proteínas, la señalización celular y un ambiente antigénico para crear un ambiente luminal adecuado para el almacenamiento de los espermatozoides (Cornwall & Hsia, 1997; Hu *et al.*, 2018; Carvajal *et al.*, 2018).

Al realizar la comparación de los índices de fluorescencia de CRISP1, PMCA4 y ADAM7 entre la etapa de maduración (octubre) y almacenamiento (febrero), se observa que en *C. mexicanus* CRISP1 y ADAM7 no muestran diferencias significativas. PMCA4 muestra una disminución de expresión durante el almacenamiento prolongado (Fig. 9).

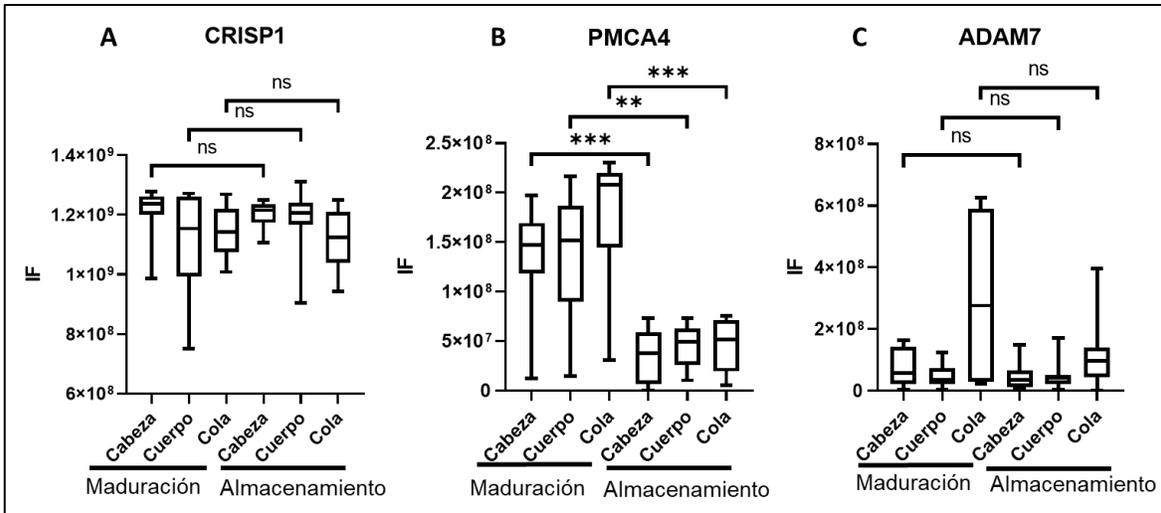


Fig. 9 Comparación de los índices de inmunofluorescencia de las tres regiones del epidídimo entre los meses de octubre y febrero. A) CRISP1, B) PMCA4 y C) ADAM7. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre cada una de las regiones del epidídimo (caput, corpus, cauda) entre cada mes, las diferencias no significativas se muestran como ns. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

Se ha observado que una expresión baja de PMCA4 en las células promueve la apoptosis por niveles elevados del $[Ca^{2+}]_i$, ya que la bomba es capaz de disminuir los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ evitando el acumulamiento (Schwab et al., 2002). La caspasa 3, es una proteína ejecutora que escinde proteínas y provoca la fragmentación nuclear del ADN en la apoptosis (Samano, 2021). Además de que la caspasa 3 tiene la capacidad de escindir a PMCA4 en el dominio de unión a calmodulina cuando su expresión esta disminuida en las células, promoviendo la apoptosis celular (Schwab et al., 2002). En *C. mexicanus*, se ha descrito que la caspasa 3 se mantiene activa en los espermatozoides durante el periodo de almacenamiento espermático epididimario y se considera que participe, por una parte, en la maduración de los espermatozoides durante el periodo de almacenamiento y su eliminación al final del periodo de este largo periodo de almacenamiento (Samano, 2021).

Por lo tanto, es probable que en *C. mexicanus*, la presencia de caspasa 3 en espermatozoides (Samano, 2021) y en el tejido epididimario (Lee et al., 2013) escinda los restos de una baja expresión de PMCA4 al final de la etapa de almacenamiento, para eliminar los espermatozoides que no fueron eyaculados en las copulas y permitir la regresión del tejido epididimario durante el periodo de inactividad reproductiva (León-Galván et al., 2005), esto último observado en

Artibeus lituratus, un murciélago de reproducción estacional, que presentó un incremento en el índice de células apoptóticas en el epidídimo durante el periodo no reproductivo (Campolina-Silva *et al.*, 2019).

Conclusión

En *C. mexicanus* las proteínas CRISP1, PMCA7 y ADAM7 juegan un papel importante durante la maduración al crear un ambiente luminal ideal para la maduración de los espermatozoides, que durante esta etapa *C. mexicanus* posiblemente presente un ambiente hiperosmolar que retrase la maduración de tal modo que esta termine en la cauda. Además, este retraso puede ser apoyado por cambios en los flujos de calcio en el epidídimo y en los espermatozoides, sobre todo porque *C. mexicanus* es una especie con que presenta una reducción en su temperatura corporal durante el periodo invernal.

Tanto PMCA4 como CRISP1 van a estar mediando las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$, permitiendo que se lleve a cabo la P-Tyr, la adquisición de la movilidad progresiva y evitando la capacitación prematura. En el caso de ADAM7, este le va a conferir al espermatozoide una osmorregulación adecuada, esto es de importancia para los espermatozoides de *C. mexicanus*, ya que estos necesitan regular adecuadamente sus concentraciones iónicas ante un ambiente hiperosmolar que va a retrasar los eventos de la maduración espermática.

En la etapa de almacenamiento, el papel de las tres proteínas probablemente sea meramente el de mantener la integridad del tejido epididimario para evitar cambios en el ambiente luminal para propiciar la quiescencia de los espermatozoides. Particularmente, PMCA4 parece tener un papel adicional, que sería la regresión del tejido epididimario al final del almacenamiento, esta regresión del tejido sería conducida por activación de la apoptosis a través de un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} en las células del epidídimo y los espermatozoides.

Bibliografía

Aitken, R. J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A. J., Lee, Y. H., & Baker, M. A. 2007. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian journal of andrology*. 9(4): 554-564.

Altringham, J. D. 2001. Reproduction and development:113-126. In *Bats: From Evolution to Conservation*. Second Edition. Oxford University Press.

Alvau, A., Battistone, M. A., Gervasi, M. G., Navarrete, F. A., Xu, X., Sánchez-Cárdenas, C., ... & Visconti, P. E. (2016). The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development*. 143(13): 2325-2333.

Arenas-Ríos, E., Rosado, G. A., Cortés-Barberena, E., Königsberg, M., Arteaga-Silva, M., Rodríguez-Tobón, A., Fuentes-Mascorro, G., & León-Galván, M. A. 2016. Reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity during epididymal sperm maturation in *Corynorhinus mexicanus* bats. *Reproductive biology*. 16(1):78-86.

Arévalo, L., Brukman, N. G., Cuasnicú, P. S., & Roldan, E. R. 2020. Evolutionary analysis of genes coding for Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) in mammals. *BMC evolutionary biology*. 20(1):1-13.

Bates, E. E., Fridman, W. H., & Mueller, C. G. (2002). The ADAMDEC1 (decysin) gene structure: evolution by duplication in a metalloprotease gene cluster on chromosome 8p12. *Immunogenetics*. 54(2): 96-105.

Brandenburger, T., Strehler, E. E., Filoteo, A. G., Caride, A. J., Aumüller, G., Post, H., ... & Wilhelm, B. (2011). Switch of PMCA4 splice variants in bovine epididymis results in altered isoform expression during functional sperm maturation. *Journal of Biological Chemistry*. 286(10):7938-7946.

Buchwalow, I. B., & Böcker, W. 2010. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Springer. Germany. 33-39.

Busso, D., Cohen, D. J., Maldera, J. A., Dematteis, A., & Cuasnicú, P. S. 2007. A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biology of reproduction*. 77(5):848-854.

Campolina-Silva, G. H., Hess, R. A., & Oliveira, C. A. (2019). Seasonal variation of cell proliferation and apoptosis in the efferent ductules and epididymis of the Neotropical bat *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *General and Comparative Endocrinology*. 273:3-10.

Carvajal, G., Brukman, N. G., Muñoz, M. W., Battistone, M. A., Guazzone, V. A., Ikawa, M., Haruhiko, M., Lustig, L., Breton, S., & Cuasnicú, P. S. 2018. Impaired male fertility and abnormal epididymal epithelium differentiation in mice lacking CRISP1 and CRISP4. *Scientific reports*. 8(1):1-19.

Casewell, N. R. (2012). On the ancestral recruitment of metalloproteinases into the venom of snakes. *Toxicon*. 60(4): 449-454.

Cervantes, M. I., Arenas-Ríos, E., León-Galván, M. Á., López-Wilchis, R., Ambriz, D., & Rosado, A. 2008. Spermatozoa Epididymal Maturation in the Mexican Big-Eared Bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 54:4-5.

Chen, Q., Peng, H., Lei, L., Zhang, Y., Kuang, H., Cao, Y., ... & Duan, E. (2011). Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration. *Cell research*. 21(6):922-933.

Cho, C., O'Dell Bunch, D., Faure, J. E., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P., & Myles, D. G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science*. 281(5384):1857-1859.

Choi, H., Han, C., Jin, S., Kwon, J. T., Kim, J., Jeong, J., ... & Cho, C. (2015). Reduced fertility and altered epididymal and sperm integrity in mice lacking ADAM7. *Biology of reproduction*. 93(3):70-1.

Choudhuri, S. 2014. Phylogenetic Analysis. En *Bioinformatics for Beginners*. (pp. 209-218). Academic Press.

Cohen, D. J., Ellerman, D. A., & Cuasnicú, P. S. 2000a. Mammalian Sperm-Egg Fusion: Evidence That Epididymal Protein DE Plays a Role in Mouse Gamete Fusion. *Biology of reproduction*. 63(2):462-468.

Cohen, D. J., Rochwerger, L., Ellerman, D. A., Morgenfeld, M. M., Busso, D., & Cuasnicú, P. S. 2000b. Relationship Between the Association of Rat Epididymal Protein “DE” With Spermatozoa and the Behavior and Function of the Protein. *Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 56(2):180-188.

Collins, L., Mu, X. M., & Chang, C. 2002. Androgens and the Androgen Receptor Male Sex Development and Fertility. In: Chang, C. Androgens and Androgen Receptor: Mechanisms, Functions, and Clinical Applications. *Springer Science & Business Media*. pp.299-324.

Cornwall, G. A. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*. 15(2):213–227.

Cornwall, G. A., & Hsia, N. (1997). ADAM7, a member of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) gene family is specifically expressed in the mouse anterior pituitary and epididymis. *Endocrinology*. 138(10):4262-4272.

Crichton, E. G., Hinton, B. T., Pallone, T. L., & Hammerstedt, R. H. (1994). Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 267(5):R1363-R1370.

Curci, L., Brukman, N. G., Weigel Muñoz, M., Rojo, D., Carvajal, G., Sulzyk, V., ... & Cuasnicu, P. S. 2020. Functional redundancy and compensation: deletion of multiple murine Crisp genes reveals their essential role for male fertility. *The FASEB Journal*. 34(12):15718-15733.

Da Ros, V. G., Maldera, J. A., Willis, W. D., Cohen, D. J., Goulding, E. H., Gelman, D. M., Rubinstein, M., Eddy, E. M., & Cuasnicú, P. S. 2008. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Developmental biology*. 320(1):12-18.

Dacheux, J. L., & Dacheux, F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*. 147(2): R27-R42.

Dadras, H., Boryshpolets, S., Golpour, A., Policar, T., Blecha, M., & Dzyuba, B. (2019). Effects of temperature on sperm motility of burbot *Lota lota*: spontaneous activation and calcium dependency. *Journal of Fish Biology*. 95(4):1137-1144.

Ellerman, D. A., Cohen, D. J., Da Ros, V. G., Morgenfeld, M. M., Busso, D., & Cuasnicú, P. S. 2006. Sperm protein “DE” mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Developmental biology*. 297(1):228-237.

Ernesto, J. I., Weigel, M. M., Battistone, M. A., Vasen, G., Martínez-López, P., Orta, G., Figueiras-Fierro, D., de la Vega-Beltrán, J., Moreno, I. A., Guidobaldi, H. A., Giojalas, L., Darszon A., Cohen, D. J., & Cuasnicú, P. S. 2015. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *Journal of Cell Biology*. 210(7):1213-1224.

Florman, H. M., & Fissore, R. A. Fertilization in Mammals. In: Knobil, E. and Neill, J. D. (Eds): *Physiology of Reproduction*. Academic Press, USA. pp. 149-196.

Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S., & Fardilha, M. 2017. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction*. 96(1): 2-12.

Fry, B. G. 2005. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome research*. 15(3): 403-420.

Gaikwad, A. S., Hu, J., Chapple, D. G., & O’Bryan, M. K. 2020. The functions of CAP superfamily proteins in mammalian fertility and disease. *Human reproduction update*. 26(5):689-723.

Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. 2017. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*. 5(2):204-218.

Gibbs, G. M., Roelants, K. & O'Bryan, M. K. 2008. The CAP Superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins—Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense. *Endocrine Reviews*. 29(7):865–897.

Gibbs, G. M., Orta, G., Reddy, T., Koppers, A. J., Martínez-López, P., de la Vega-Beltrán, J. L., Loa, C. Y. J., Veldhuisc, N., Jamsaia, D., McIntyre, P. & Darszon, A. & O'Bryana, M. K. 2011. Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(17):7034-7039.

Girouard, J., Frenette, G., & Sullivan, R. 2009. Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*. 80(5): 965-972.

Grinshtain, E., Shpungin, S., Baum, M., Nir, U., & Breitbart, H. (2022). The Fer tyrosine kinase protects sperm from spontaneous acrosome reaction. *Developmental Biology*. 487: 24-33.

Grinshtain, E., Shpungin, S., Baum, M., Nir, U., & Breitbart, H. (2022). The Fer tyrosine kinase protects sperm from spontaneous acrosome reaction. *Developmental Biology*. 487:24-33.

Han, C., Park, I., Lee, B., Jin, S., Choi, H., Kwon, J. T., ... & Cho, C. (2011). Identification of heat shock protein 5, calnexin and integral membrane protein 2B as Adam7-interacting membrane proteins in mouse sperm. *Journal of Cellular Physiology*. 226(5):1186-1195.

Harper, C. V., Barratt, C. L., & Publicover, S. J. 2004. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte: Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *Journal of Biological Chemistry*. 279(44): 46315-46325.

Hawkins, J. A., Kaczmarek, M. E., Müller, M. A., Drosten, C., Press, W. H., & Sawyer, S. L. 2019. A metaanalysis of bat phylogenetics and positive selection based on

genomes and transcriptomes from 18 species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 116(23): 11351-11360.

Hayashi, M., Fujimoto, S., Takano, H., Ushiki, T., Abe, K., Ishikura, H., Yoshida, M. C., Kirchhoff, C., Ishibashi, T., & Kasahara, M. 1996. Characterization of a Human Glycoprotein with a Potential Role in Sperm–Egg Fusion: cDNA Cloning, Immunohistochemical Localization, and Chromosomal Assignment of the Gene (AEGL1). *Genomics*. 32(3):367-374.

Hess, R. A. 2018. Efferent ductules: Structure and function. En *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 270-278). Elsevier.

Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. 2015. The Western Blot. En *ELISA: Methods and Protocols*. (pp. 87-96). Springer.

Hu, J., Merriner, D. J., O'Connor, A. E., Houston, B. J., Furic, L., Hedger, M. P., & O'Bryan, M. K. 2018. Epididymal cysteine-rich secretory proteins are required for epididymal sperm maturation and optimal sperm function. *Molecular Human Reproduction*. 24(3):111–122.

Jalkanen, J., Huhtaniemi, I., & Poutanen, M. 2005. Mouse Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (CRISP4): A Member of the Crisp Family Exclusively Expressed in the Epididymis in an Androgen-Dependent Manner. *Biology of reproduction*. 72(5):1268-1274.

Jia, F., Lo, N., & Ho, S. Y. 2014. The impact of modelling rate heterogeneity among sites on phylogenetic estimates of intraspecific evolutionary rates and timescales. *PLoS One*. 9(5): e95722.

Kim, T., Oh, J., Woo, J. M., Choi, E., Im, S. H., Yoo, Y. J., ... & Cho, C. (2006). Expression and relationship of male reproductive ADAMs in mouse. *Biology of reproduction*. 74(4):744-750.

Koch, S. 2017. Multiple Immunochemical Staining Techniques. En *Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Essential Methods*. John Wiley & Sons. 103-122 p.

Kosiol, C., Vinař, T., da Fonseca, R. R., Hubisz, M. J., Bustamante, C. D., Nielsen, R., & Siepel, A. 2008. Patterns of positive selection in six mammalian genomes. *PLoS genetics*. 4(8): e1000144.

Krätzschar, J., Haendler, B., Eberspaecher, U., Roosterman, D., Donner, P., & Schleuning, W. D. 1996. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *European journal of biochemistry*. 236(3):827-836.

Lambert, H. (1981). Temperature dependence of capacitation in bat sperm monitored by zona-free hamster ova. *Gamete Research*. 4(6):525-533.

Lee, I. C., Kim, K. H., Kim, S. H., Baek, H. S., Moon, C., Kim, S. H., ... & Kim, J. C. (2013). Apoptotic cell death in rat epididymis following epichlorohydrin treatment. *Human & experimental toxicology*. 32(6):640-646.

Légaré, C., Bérubé, B., Boué, F., Lefièvre, L., Morales, C. R., El-Alfy, M., & Sullivan, R. 1999. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 52(2):225-233.

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

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

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

Lim, S., Kierzek, M., O'Connor, A. E., Brenker, C., Merriner, D. J., Okuda, H., ... & O'Bryan, M. K. 2019. CRISP2 is a regulator of multiple aspects of sperm function and male fertility. *Endocrinology*. 160(4): 915-924.

Liu, H. W., Lin, Y. C., Chao, C. F., Chang, S. Y., & Sun, G. H. (2000). GP-83 and GP-39, two glycoproteins secreted by human epididymis are conjugated to spermatozoa during maturation. *Molecular human reproduction*. 6(5):422-428.

Maldera, J. A., Vasen, G., Ernesto, J. I., Weigel-Muñoz, M., Cohen, D. J., & Cuasnicú, P. S. 2011. Evidence for the involvement of zinc in the association of CRISP1 with rat sperm during epididymal maturation. *Biology of reproduction*. 85(3):503-510.

Martínez, J. M. D. 2012. Relación de la testosterona testicular, el fotoperiodo y la temperatura con el patrón reproductivo asincrónico en murciélagos machos *Corynorhinus mexicanus*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana.

Martínez, R. I. 2021. Evidencias de maduración espermática durante el almacenamiento prolongado en hembras del murciélago *Corynorhinus mexicanus*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana.

Martínez-López, P., Treviño, C. L., de la Vega-Beltrán, J. L., De Blas, G., Monroy, E., Beltrán, C., Orta, G., Gibbs, G. M., O'Bryan, M. K., & Darszon, A. 2011. TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *Journal of cellular physiology*. 226(6):1620-1631.

Nishimura, H., & L'Hernault, S. W. 2017. Spermatogenesis. *Current Biology*. 27(18): R988-R994.

Nishimura, H., Cho, C., Branciforte, D. R., Myles, D. G., & Primakoff, P. (2001). Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin β . *Developmental biology*. 233(1):204-213.

Nishimura, H., Myles, D. G., & Primakoff, P. (2007). Identification of an ADAM2-ADAM3 complex on the surface of mouse testicular germ cells and cauda epididymal sperm. *Journal of Biological Chemistry*. 282(24):17900-17907.

Nixon, B., Asquith, K. L., & Aitken, R. J. (2005). The role of molecular chaperones in mouse sperm–egg interactions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 240(1-2):1-10.

Nolan, M. A., Wu, L., Bang, H. J., Jelinsky, S. A., Roberts, K. P., Turner, T. T., Kopf, G. S., & Johnston, D. S. 2006. Identification of Rat Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (Crisp4) as the Ortholog to Human CRISP1 and Mouse Crisp4. *Biology of reproduction*. 74(5):984-991.

Oh, J. S., Han, C., & Cho, C. (2009). ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Molecules and Cells*. 28(5):441-446.

Oh, J., Woo, J. M., Choi, E., Kim, T., Cho, B. N., Park, Z. Y., ... & Cho, C. (2005). Molecular, biochemical, and cellular characterization of epididymal ADAMs, ADAM7 and ADAM28. *Biochemical and biophysical research communications*. 331(4):1374-1383.

Oxberry B. A. 1979. Female reproductive patterns in hibernating bats. *J. Reprod. Fert.* 56:359-367.

Patel, R., Al-Dossary, A. A., Stabley, D. L., Barone, C., Galileo, D. S., Strehler, E. E., & Martin-DeLeon, P. A. (2013). Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4 in murine epididymis: secretion of splice variants in the luminal fluid and a role in sperm maturation. *Biology of reproduction*. 89(1):6-1.

Posada, D., & Buckley, T. R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *En Syst. Biol.* 53(5): 793–808.

Racey, Paul A. 1982. Ecology of Bat Reproduction. In *Ecology of bats*: 57–93. Kunz, T.H. (Ed.). First Edition. New York: Plenum Press.

Rastogi, S., & Liberles, D. A. 2005. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC evolutionary biology*. 5(1):1-7.

Riedesel, M. L., & Folk Jr, G. E. 1958. Serum electrolyte levels in hibernating mammals. *The American Naturalist*. 92(866):307-312.

Rivera, A. M., & Swanson, W. J. 2022. The Importance of Gene Duplication and Domain Repeat Expansion for the Function and Evolution of Fertilization Proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 10:827454.

Robaire, B., & Hinton, B. T. 2015. The Epididymis. In: Knobil, E. and Neill, J. D. (Eds): Physiology of Reproduction. *Academic Press, USA*. pp. 1071-1148.

Roberts, K. P., Ensrud, K. M., & Hamilton, D. W. 2002. A comparative analysis of expression and processing of the rat epididymal fluid and sperm-bound forms of proteins D and E. *Biology of reproduction*. 67(2): 525-533.

Roberts, K. P., Ensrud, K. M., Wooters, J. L., Nolan, M. A., Johnston, D. S., & Hamilton, D. W. 2006. Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Molecular and cellular endocrinology*. 250(1-2): 122-127.

Roberts, K. P., Ensrud-Bowlin, K. M., Piehl, L. B., Parent, K. R., Bernhardt, M. L., & Hamilton, D. W. 2008. Association of the protein D and protein E forms of rat CRISP1 with epididymal sperm. *Biology of reproduction*. 79(6): 1046-1053.

Roberts, K. P., Wamstad, J. A., Ensrud, K. M., & Hamilton, D. W. 2003. Inhibition of Capacitation-Associated Tyrosine Phosphorylation Signaling in Rat Sperm by Epididymal Protein Crisp-1. *Biology of reproduction*. 69(2):572-581.

Rodríguez-Tobón, A. 2011. Análisis macro y microestructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana

Rodríguez-Tobón, A. 2016. Estudio de la maduración de espermatozoides epididimarios del murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana.

Rodríguez-Tobón, A., Fierro, R., León-Galván, M. A., Rosado, A., Cortés-Barberena, E., & Arenas-Ríos, E. 2016. Tyrosine phosphorylation as evidence of epididymal cauda participation in the sperm maturation process of *Corynorhinus mexicanus* bat. *Acta Zoologica*. 97:310-318.

Rodríguez-Tobón, A., León-Galván, M. A., & Arenas-Ríos E. 2015. Epididymal Sperm Maturation in Bats with Prolonged Sperm Storage. *Animal and Veterinary Sciences*. 3(1-2):1-7.

Román R. R 2010. Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D.F., 39 pp.

Samano, B. G. A. 2021. Marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios durante el almacenamiento prolongado en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana.

Schwab, B. L., Guerini, D., Didszun, C., Bano, D., Ferrando-May, E., Fava, E., ... & Nicotera, P. (2002). Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death & Differentiation*. 9(8): 818-831.

Serres, C., & Marie-Louise, K. A. N. N. (1984). Motility induction in hamster spermatozoa from caput epididymidis: effects of forward motility protein (FMP) and calmodulin inhibitor. *Reproduction Nutrition Développement*. 24(1):81-94.

Setiawan, R., Priyadarshana, C., Tajima, A., Ishikawa, N., & Asano, A. (2019, October). Localization of Plasma Membrane Calcium ATPase 2 and 4 (PMCA2 and PMCA4) in Chicken Sperm. In IOP Conference Series: Earth and *Environmental Science*. 334(1): 012014. IOP Publishing.

Sheffield, N. C. 2013. The interaction between base compositional heterogeneity and among-site rate variation in models of molecular evolution. *International Scholarly Research Notices Evolutionary Biology*, 2013.

Sheng, J., Gadella, B. M., Olrichs, N. K., Kaloyanova, D. V., & Helms, J. B. 2021. The less conserved metal-binding site in human CRISP1 remains sensitive to zinc ions to permit protein oligomerization. *Scientific reports*, 11(1):1-10.

Shum, W., Zhang, B. L., Cao, A. S., Zhou, X., Shi, S. M., Zhang, Z. Y., ... & Shi, S. (2022). Calcium homeostasis in the epididymal microenvironment: Is extracellular calcium a cofactor for matrix gla protein-dependent scavenging regulated by vitamins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 10:185.

Sikes, R. S., & Gannon, W. L. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*. 92(1):235–253.

Sitia, R., & Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*. 426(6968):891-894.

Sivashanmugam, P., Richardson, R. T., Hall, S., Hamil, K. G., French, F. S., & O'rand. 1999. Cloning and Characterization of an Androgen-Dependent Acidic Epididymal Glycoprotein/CRISPI-like Protein from the Monkey. *Journal of andrology*. 20(3):384-393.

Sullivan, R. 2015. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian journal of andrology*. 17(5): 726.

Sullivan, R., & Saez, F. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*. 146(1): R21-R35.

Sullivan, R., Frenette, G., & Girouard, J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian journal of andrology*. 9(4): 483-491.

Sun, G. H., Lin, Y. C., Guo, Y. W., Chang, S. Y., & Liu, H. W. (2000). Purification of GP-83, a glycoprotein secreted by the human epididymis and conjugated to mature spermatozoa. *Molecular human reproduction*. 6(5):429-434.

Sun, R., Liang, H., Guo, H., Wang, Z., & Deng, Q. (2021). PMCA4 gene expression is regulated by the androgen receptor in the mouse testis during spermatogenesis. *Molecular Medicine Reports*. 23(2):1-1.

Sun, X. H., Zhu, Y. Y., Wang, L., Liu, H. L., Ling, Y., Li, Z. L., & Sun, L. B. 2017. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 15(1): 65.

Turunen, H. T., Sipilä, P., Krutskikh, A., Toivanen, J., Mankonen, H., Hämäläinen, V., Björkgren, I., Huhtaniemi, I., & Poutanen, M. 2012. Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. *Biology of reproduction*. 86(1):12,1-8.

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

Vadnais, M. L., Foster, D. N., & Roberts, K. P. 2008. Molecular cloning and expression of the CRISP family of proteins in the boar. *Biology of reproduction*. 79(6):1129-1134.

Vicens, A., & Treviño, C. L. 2018. Positive Selection in the Evolution of Mammalian CRISPs. *Journal of molecular evolution*. 86(9):635-645.

Voisin, A., Saez, F., Drevet, J. R., & Guiton, R. (2019). The epididymal immune balance: a key to preserving male fertility. *Asian journal of andrology*. 21(6):531.

Weigel-Muñoz, M., Battistone, M. A., Carvajal, G., Maldera, J. A., Curci, L., Torres, P., Lombardo, D., Pignataro, O. P., Da Ros, V. G., & Cuasnicú, P. S. 2018. Influence of the genetic background on the reproductive phenotype of mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Biology of reproduction*. 99(2): 373-383.

Weigel-Muñoz, M., Carvajal, G., Curci, L., González, S. N., & Cuasnicú, P. S. 2019. Relevance of CRISP proteins for epididymal physiology, fertilization, and fertility. *Andrology*. 7(5):610-617.

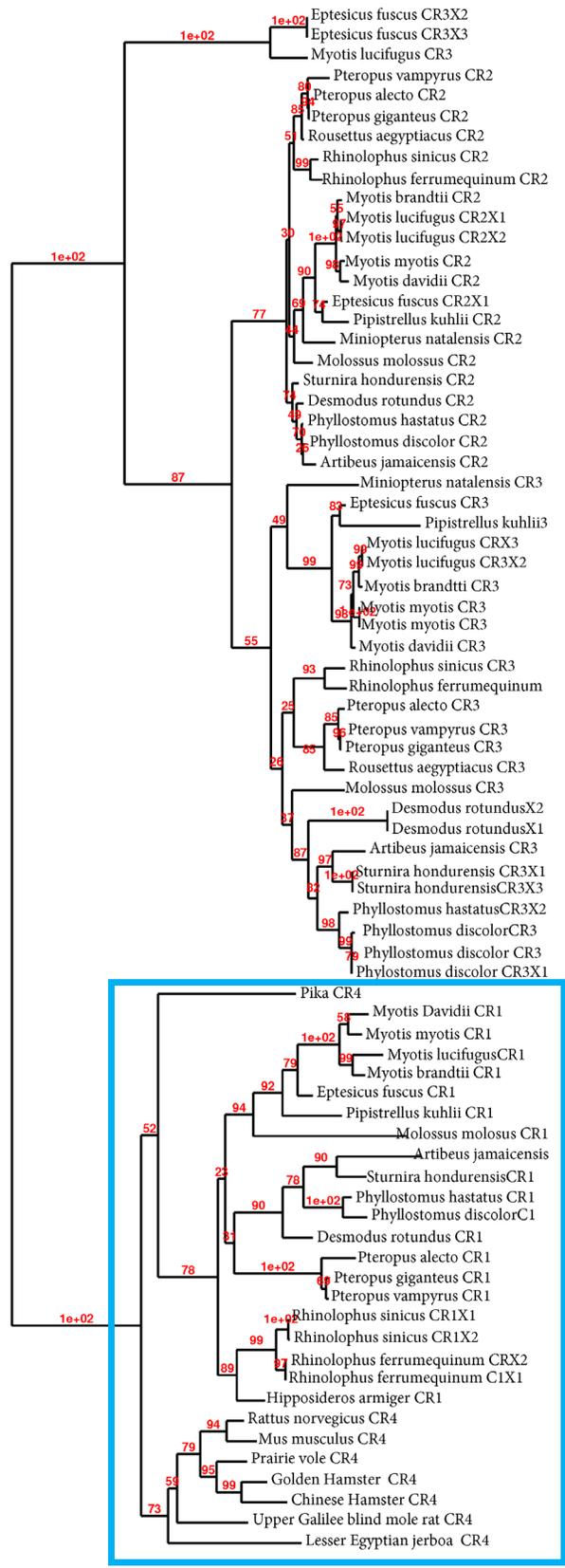
Wennemuth, G., Babcock, D. F., & Hille, B. (2003). Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *The Journal of general physiology*. 122(1):115-128.

Wennemuth, G., Carlson, A. E., Harper, A. J., & Babcock, D. F. 2003. Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. *Development*. 130 (7): 1317–1326.

Yuan, R., Primakoff, P., & Myles, D. G. (1997). A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm–egg plasma membrane adhesion and fusion. *The Journal of cell biology*. 137(1):105-112.

Zhou, W., De Iuliis, G. N., Dun, M. D., & Nixon, B. 2018. Characteristics of the epididymal luminal environment responsible for sperm maturation and storage. *Frontiers in endocrinology*. 9:1-13.

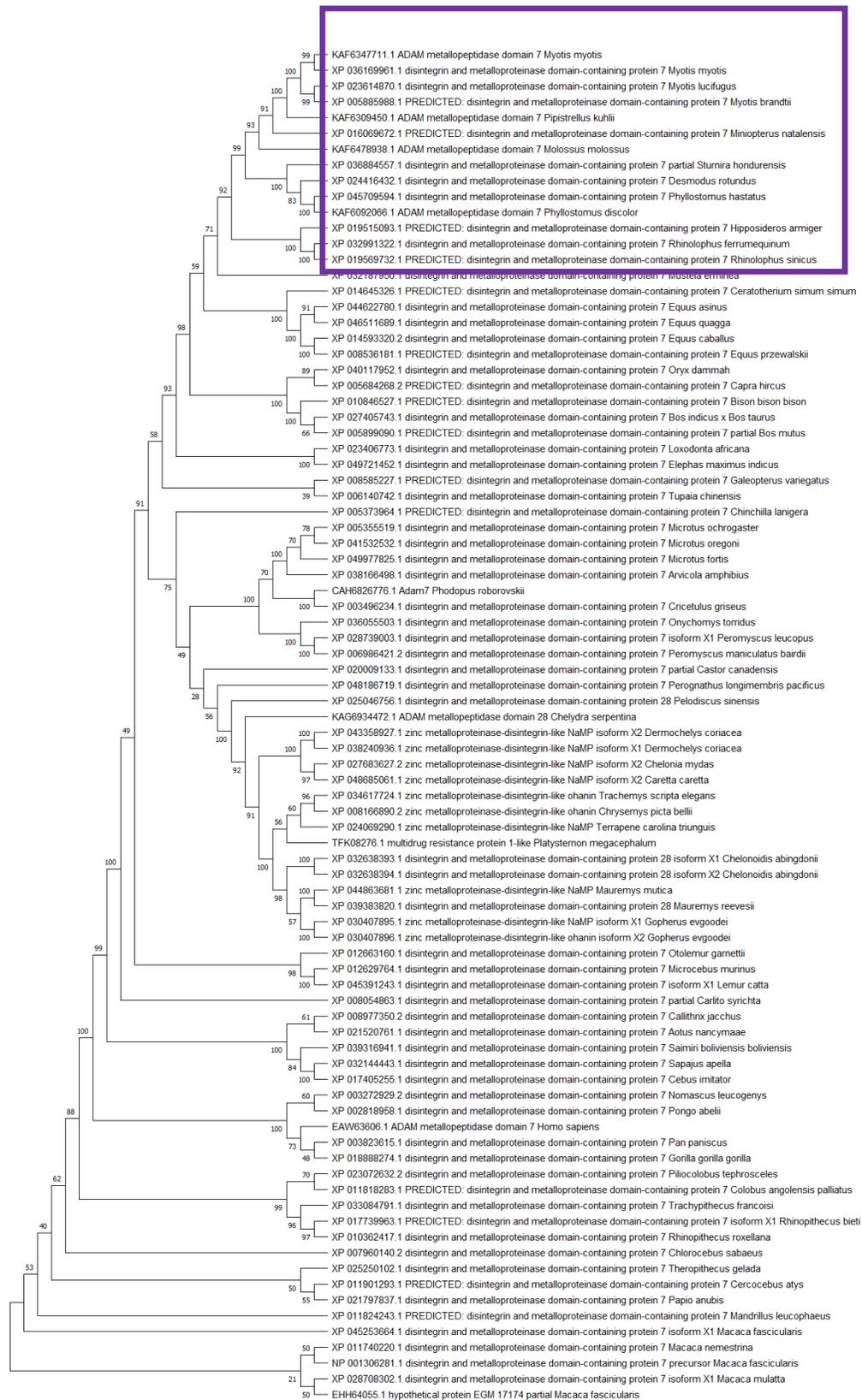
ANEXOS



Anexo 2 Filogenia de CRISP1-3 quirópteros/CRISP4 de roedor



Anexo 3 Filogenia de PMCA4 para diferentes mamíferos y aves



Anexo 4 Filogenia de ADAM7 para diferentes mamíferos y reptiles

Lista de abreviaciones

CRISP: Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína

GSK-3: Glucógeno sintasa quinasa 3

TPMR8: Receptor de Potencial Transitorio, subfamilia melastatina, miembro 8

P-Tyr: Fosforilación de tirosinas

ADAM: Desintegrina y Metaloproteasa

PMCA: ATPasa de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática

ITM2B: Proteína integral de membrana tipo II

P₄: Progesterona