

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**RELACIÓN DE LA TESTOSTERONA TESTICULAR,
EL FOTOPERIODO Y LA TEMPERATURA CON EL
PATRÓN REPRODUCTIVO ASINCRÓNICO EN
MURCIÉLAGOS MACHOS *CORYNORHINUS
MEXICANUS*.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

BIÓLOGA MERCEDES DAISY MARTINEZ JAIMES

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR DR. MARIO GARCÍA LORENZANA

ASESOR DR. MIGUEL ANGEL LEÓN GALVÁN

ASESORA DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

ENERO 2012

**“La Maestría en Biología de la Universidad
Autónoma Metropolitana pertenece al Patrón de
Posgrados de Excelencia del CONACYT y además
cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el
convenio PFP-20-93”.**

El jurado designado por la Coordinación de Biología de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presento:

Bióloga Mercedes Daisy Martínez Jaimes

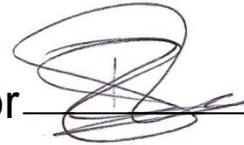
El día 4 de Enero del 2012

Miembros del jurado:

Asesor: Dr. Miguel Ángel León Galván



Asesora: Rosa María Viguera Villaseñor



Sinodal: Dr. Francisco Jiménez Trejo



Sinodal: Dr. Matías Martínez Coronel



RESUMEN

Existen dos patrones de reproducción en los mamíferos, los continuos y los estacionales. En los mamíferos estacionales el ciclo reproductivo masculino depende de los factores ambientales y está caracterizado por fases de reanudación y regresión testicular, que delimitan el periodo de actividad de la espermatogénesis. Los murciélagos estacionales habitan en zonas templadas frías y presentan tres patrones reproductivos: sincrónico I (espermatogénesis y apareamiento al mismo tiempo), sincrónico II (antes de que termine la espermatogénesis comienza el apareamiento) y asincrónico (espermatogénesis y apareamiento se encuentran desfasados). *Corynorhynchus mexicanus* es un murciélago endémico de México y habita en los principales sistemas montañosos; es un hibernante facultativo que pasa por fases diarias de torpor, disminuye su metabolismo y su temperatura corporal; presenta un solo ciclo reproductivo al año, con un patrón asincrónico estacional en donde el apareamiento se realiza tiempo después que ha cesado la espermatogénesis; en este patrón reproductivo se observa un prolongado almacenamiento de espermatozoides. Los factores ambientales fundamentales para el éxito reproductivo de los murciélagos son: el alimento, la temperatura, el fotoperiodo y la precipitación. En general, la reproducción coincide con los valores más elevados de los factores climáticos. La actividad espermatogénica está regulada por la secreción de hormonas hipofisiarias (luteinizante y folículo-estimulante) y controladas por el hipotálamo, que a su vez se ve influido hormonalmente. Las hormonas de tipo androgénico desempeñan un papel fundamental en la coordinación

de las actividades reproductivas en respuesta a los cambios fisiológicos y a las condiciones ambientales. Las células de Leydig realizan la síntesis y la secreción de andrógenos, siendo la testosterona (T) uno de los más importantes; es posible determinar la actividad reproductiva de un individuo a partir de las características morfofisiológicas de estas células. El objetivo del presente trabajo fue: determinar si existe una relación entre el número de células de Leydig productoras de testosterona, el fotoperiodo y la temperatura con el patrón reproductivo. El periodo activo de la espermatogénesis comprende en promedio de mayo-agosto, en tanto que la etapa de almacenamiento espermático de septiembre-octubre, el apareamiento de noviembre-enero y la inactividad de febrero-abril. El volumen testicular sufre cambios a través de estas etapas: el aumento del volumen testicular reinicia en el periodo comprendido entre mayo y agosto, cuando ocurre principalmente la fase proliferativa de la espermatogénesis. Los valores más altos en el número total de células de Leydig por sección histológica del testículo se dieron en la etapa de espermatogénesis, además se observó un incremento en las dimensiones de las células, lo cual coincide con los resultados obtenidos al medir la densidad óptica de la señal inmunohistoquímica de testosterona, la cual también aumenta en este periodo. La temperatura ambiente y el fotoperiodo presentan un aumento de mayo-agosto, cuando se presenta el verano y la actividad espermatogénica. Estos resultados, en conjunto sugieren que los niveles de testosterona de producción intratesticular son importantes en la producción espermática y se relacionan con la variación de la temperatura ambiente y el

fotoperiodo. Consecuentemente las condiciones ambientales influyen de manera significativa la fase de espermatogénesis y no así la de apareamiento en relación a la producción de testosterona intratesticular.

ABSTRACT

There are two patterns of reproduction in mammals, the continuous and the seasonal. In the seasonal mammals the reproductive cycle depends on environmental factors and is characterized by stages of recrudescence and testicular regression, which delimit the period of activity of spermatogenesis. The bats seasonal living in cold temperate and have three reproductive patterns: synchronous I (spermatogenesis and mating at the same time), synchronous II (before the end of spermatogenesis begins mating) and asynchronous (spermatogenesis and mating are outdated). *Corynorhynchus mexicanus* is a bat endemic to Mexico and live in major mountain systems; is an optional hibernating phases passing through daily torpor, lowers your metabolism and body temperature; showing a single year reproductive cycle, with a seasonal asynchronous pattern where mating takes place after spermatogenesis has ceased, in this reproductive pattern observed prolonged storage of spermatozoa. The fundamental environmental factors for reproductive success of bats are: food, temperature, photoperiod and precipitation. In general, the reproduction coincides with the peak of abundance of the environmental facts. The spermatogenic activity is regulated by the secretion of pituitary hormones (luteinizing and follicle stimulating) and controlled by the hypothalamus, which in turn is influenced hormonally. Androgen hormones play a key role in the coordinating of reproductive activity in response to

physiological changes and environmental conditions. Leydig cells realize the synthesis and secretion of androgens, with testosterone (T) one of the most important, it is possible to determine reproductive activity throughout the show morphological characteristics of these cells. The aim of this study was to: determine whether a relationship exists between the number of Leydig cells testosterone production, photoperiod and temperature with the reproductive pattern. The active period of spermatogenesis includes on average from May to August, the sperm storage period September-October, the November-January mating and inactivity from February to April. Testicular volume growth restarts in the period between May and August, occurs mainly when the proliferative phase of spermatogenesis. The highest values in the total number of Leydig cells per testis histological section were in the stage of spermatogenesis, it was observed an increase in cell size, which coincides with the results obtained by measuring the optical density of immunohistochemical signal testosterone which, also increases during this period. The room temperature and photoperiod exhibit increased from May to August, when presents the summer and the spermatogenic activity. These results suggest that levels of intratesticular testosterone production are important in the sperm production and related to the variation of temperature and photoperiod. Consequently environmental conditions significantly influence the phase of spermatogenesis and thus no mating in relation to intratesticular testosterone production.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Patrones de reproducción de los mamíferos.....	1
1.1.1. Patrón de reproducción continuo	1
1.1.2. Patrón de reproducción estacional.....	2
1.1.2.1. Patrones reproductores masculinos de los murciélagos estacionales.	4
1.1.2.2. <i>Corynorhinus mexicanus</i>	6
1.2. Factores que participan en la regulación de la reproducción	8
1.2.1. Factores externos:.....	9
Fotoperiodo	9
1.2.2. Factores internos que regulan la reproducción	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. OBJETIVO.....	18
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES	19
4. HIPÓTESIS	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1. Trabajo de campo.....	20
5.2. Registro de la temperatura (ambiental, corporal y escrotal).	21
5.3. Registro del fotoperiodo.....	22
5.4. Estudio anatómico e histológico del testículo.....	22
5.5. Inmunohistoquímica para la detección de testosterona.	24
5.6. Análisis estadístico	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Registro de datos de temperatura (ambiental, corporal y escrotal) y fotoperiodo	26
6.2. Análisis de la anatomía e histología del testículo	32
6.3. Análisis de la variación en el contenido de testosterona intratesticular.	37
6.4. Análisis de correlación de los factores externos (temperatura y fotoperiodo) con el número y actividad de las células de Leydig.....	39
7. Discusión	41
8. Conclusiones	50
9. Referencias	50
10. ANEXO A.....	64

11. ANEXO B.....	66
------------------	----

Lista de figuras

Figura 1. Variación promedio mensual en la temperatura ambiental para el interior del refugio “El Túnel”, a lo largo de un ciclo anual.	29
Figura 2. Comparación de las temperaturas superficiales del cuerpo y de los órganos sexuales (testículo y epidídimo) de los murciélagos <i>C. mexicanus</i>	29
Figura 3. Variación en la temperatura media, máxima y mínima del exterior del refugio de la estación meteorológica de la Sierra de Tlaxco, Tlaxcala, durante un ciclo anual.....	31
Figura 4 Variación promedio semanal mensual del fotoperiodo (número de horas luz por día) a lo largo del ciclo anual.....	32
Figura 5. Variación del volumen testicular de los murciélagos <i>Corynorhinus mexicanus</i> en las diferentes etapas del ciclo reproductivo anual.....	33
Figura 6 Variación del número de células de Leydig por sección histológica de testículo en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i>	34
Figura 7 Longitud mayor y menor de las células de Leydig analizadas por sección histológica del testículo de murciélagos <i>Corynorhinus mexicanus</i> , en las diferentes etapas del ciclo reproductivo.....	35
Figura 8 Fotomicrografías de secciones histológicas de testículos de murciélagos <i>C. mexicanus</i> en las diferentes etapas del ciclo reproductivo.....	36
Figura 9 Fotomicrografías de secciones histológicas de testículo de <i>C. mexicanus</i> , representativas de las diferentes etapas del ciclo reproductivo.....	38
Figura 10 Densidad óptica promedio del inmunomarcaje de testosterona en las etapas del ciclo reproductivo del murciélago macho <i>C. mexicanus</i>	39
Figura11 Correlación entre los valores correspondientes a la temperatura ambiental de la zona donde se encuentra el refugio de los murciélagos, el fotoperiodo y número de células de Leydig para las diferentes etapas del ciclo reproductivo de <i>C. mexicanus</i>	40
Figura 12 Comparación entre la variación promedio en el número de células de Leydig y densidad óptica (como medida de la intensidad de la marca por inmunofluorescencia de la testosterona), con respecto a las diferentes etapas del ciclo reproductivo de <i>C. mexicanus</i>	41

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Patrones de reproducción de los mamíferos.

La reproducción de los mamíferos placentarios es un proceso complejo, que ocurre en armonía con la alimentación y con las condiciones físicas y sociales, para poder perpetuar a la especie. La reproducción en las hembras, experimenta una ovulación que puede o no ser un evento cíclico para algunos mamíferos. Cuando este es cíclico, puede variar desde pocos días hasta cerca de un mes. En algunas especies (ratas, conejos, peces, etc.), los machos son reproductivos todo el año, mientras que las hembras no. A veces la reproducción estacional es disparada por señales del fotoperiodo, en donde los individuos del sexo masculino despliegan patrones de reproducción, en base al número y temporalidad de sus ciclos reproductivos, coincidiendo con la época de ovulación de la hembra (Bronson, 1989). Existen dos patrones el continuo y estacional, que se mencionaran posteriormente.

1.1.1. Patrón de reproducción continuo

El patrón reproductivo continuo, es propio de las especies que se reproducen a lo largo de todo el año y en donde las hembras presentan más de dos ciclos estrales anuales (poliestro). Por consecuencia cada hembra puede tener dos o tres crías por año. La mayoría de los mamíferos que presentan este patrón son de climas tropicales (Bronson, 1989). En los machos el testículo está organizado por células que se encuentran estrechamente adheridas a las paredes de los túbulos seminíferos en las etapas de la espermatogénesis. Esta organización es homogénea

en todos los túbulos de la gónada y constante a través del año. Esta distribución intratubular sería un indicador de ciclos gametogénicos de tipo continuo para algunos de los mamíferos (Florman y Ducibella; 2006).

1.1.2. Patrón de reproducción estacional

La reproducción estacional, es típica de las especies que viven en regiones templadas, y los jóvenes nacen en la primavera. La mayoría de estos hábitats experimentan fluctuación estacional en la disponibilidad de alimento y poseen una marcada estacionalidad climática, condiciones que son, más pronunciadas al aumentar la latitud. Para adaptarse a estos cambios en las condiciones ambientales, la mayoría de las especies exhiben ciclos estacionales en sus funciones reproductivas. Dependiendo de las condiciones, las especies de estas latitudes pueden controlar la fenología reproductiva (gestación, nacimiento, lactación) para que coincidan con el pico de disponibilidad de alimento, y así lograr una mayor supervivencia del neonato (Malpoux, 2006).

La estacionalidad es el efecto más evidente del ambiente sobre la reproducción de los mamíferos, y tradicionalmente este es el fenómeno que ha captado el interés tanto de ecólogos como de fisiólogos. Si un mamífero se reproduce estacionalmente o continuamente depende sobre todo de su historia de vida y su medio ambiente (Bronson, 1989). Se engloban en 2 tipos de factores ambientales que controlan la reproducción estacional, los factores últimos son los que producen una presión en las especies para evolucionar como: la disponibilidad de alimento, temperatura, la

disponibilidad del agua y el número de predadores; los factores próximos: duración de la luz (ej. fotoperiodo) y la disponibilidad de alimento, son actualmente señales ambientales que se usan para el tiempo de la función reproductiva (Malpoux 2006).

En los murciélagos estos factores pueden afectar al calendario de la ovulación y la fecundación, el recrudescimiento gonadal, las tasas de post-implantación, al crecimiento y pérdida de embriones. El ambiente externo puede actuar sobre la reproducción de los murciélagos en dos diferentes formas: en primer lugar, las condiciones físicas extremas, alteran las tasas de desarrollo y crecimiento de los embriones e inhiben la fisiología reproductiva. En segundo lugar, puede influir en las vías neuroendocrinas que han evolucionado como una respuesta y afectan en las diferentes etapas reproductivas (Heidenman, 2000).

La mayoría de las especies del Orden Chiroptera poseen reproducción estacional y dentro de esta modalidad, los machos presentan dos categorías particulares: bimodal que es propia de los que presentan recrudescencia e involución testicular, en relación con la poliestría bimodal de las hembras. En la segunda categoría se incluye a las especies que presentan una sola actividad testicular por año, coincidiendo con el patrón monoéstrico de las hembras y se observa en las especies que habitan en regiones de clima frío (León-Galván, 2008).

1.1.2.1. Patrones reproductores masculinos de los murciélagos estacionales.

Los murciélagos pertenecen al orden Chiroptera que es el segundo orden más diverso de los mamíferos, presenta 1116 especies con 18 familias, superado en número de especies solo por los roedores. En México están representados por 8 familias, con 137 especies de las cuales el 10% (14 especies) son exclusivas, es decir, endémicas de México (Simmons, 2005).

Son de hábitos nocturnos o crepusculares; su actividad temporal y espacial es influida por factores ambientales como la disponibilidad de alimento y el clima. En regiones de mayor altitud las especies hibernan, entrando en torpor por varios meses (4-5 meses), donde la respiración y el ritmo cardiaco bajan a un mínimo, que les permite sobrevivir de sus reservas de grasa (Ceballos y Olivia, 2005)

En las zonas templadas y frías, la disminución de la temperatura ambiental, durante la temporada invernal provoca la reducción de tamaño de las poblaciones de insectos, que son la base de la alimentación para la mayoría de las especies de murciélagos habitantes de esta zona, por lo que dependen de la disponibilidad de alimento del verano, ya que por los cambios de la precipitación y la temperatura ambiente, estos factores en conjunto ejercen un efecto directo sobre los murciélagos y solo ciertas especies permanecen en dichas zonas, gracias a la ejecución de una conducta de aletargamiento fisiológico (Entwistle, *et al.*, 1998).

Los murciélagos que se encuentran en torpor bajan la temperatura de su cuerpo y permanecen inactivos durante varios días o incluso meses. A menudo hibernan en las cuevas donde la temperatura ambiente no desciende por debajo de congelación. Dado que el mantenimiento de una temperatura corporal elevada requiere el uso de las calorías, estos murciélagos ahorran energía sustancialmente al reducir la temperatura de su cuerpo en estado de torpor. Estos murciélagos sobreviven al invierno gracias a las reservas de grasa. El torpor es conocido al menos para algunas especies de los siguientes géneros: *Eptesicus*, *Antrozous*, *Miniopterus*, *Myotis*, *Nyctalus*, *Pipistrellus* y *Plecotus* (Dietz y Kalko, 2006).

Existen 3 patrones reproductivos en los murciélagos machos, el primer patrón es sincrónico y se caracteriza porque la espermatogénesis y el apareamiento se presentan al mismo tiempo durante un ciclo anual; en el segundo, antes de que termine la espermatogénesis comienza el apareamiento; mientras que el tercer tipo es asincrónico, ya que existe un desfase entre la espermatogénesis y el apareamiento (Kruttsch, 2000; Racey y Entwistle, 2000).

En el patrón reproductivo tipo 3, la temporada de reproducción se extiende hasta el periodo cuando ocurre el torpor invernal, por lo que el aletargamiento tiene una marcada influencia sobre la fisiología reproductiva de los individuos, propiciando la existencia de un patrón reproductivo masculino inusual, caracterizado por una asincronía temporal de las funciones sexuales (León-Galván *et al.*, 2005). La actividad espermatogénica reinicia en la primavera, alcanzando su pico a mediados o al final del verano y decrece súbitamente, quedando al poco tiempo, en condición de

inactividad total. Las evidencias morfológicas del tejido intersticial del testículo, señalan que las células de Leydig muestran características morfológicas indicativas de actividad durante el periodo de la espermatogénesis; mientras que en la fase de involución se han observado dos maneras: se mantiene en un nivel bajo de actividad o con una ligera reducción en su actividad durante el periodo de apareamiento y torpor (Gustafson, 1979).

Por otra parte, los órganos sexuales secundarios (el epidídimo y las glándulas sexuales) de esos murciélagos, experimentan recrudescencia tardíamente, alcanzan su máximo desarrollo y se encuentran repletos de espermatozoides (la región caudal del epidídimo) o de secreciones (las glándulas sexuales), durante el periodo de otoño-invierno cuando se llevan a cabo los apareamientos y los individuos entran en estado de torpor (Krutzschnig, 2000).

1.1.2.2. *Corynorhinus mexicanus*

El murciélago *Corynorhinus mexicanus*, especie objeto del presente estudio, pertenece a la familia Vespertilionidae, es un insectívoro que habita en las partes más altas y húmedas de los principales sistemas montañosos de México (Sierra madre oriental, occidental y eje volcánico transversal); es un hibernante facultativo y solo pasa por fases diarias más o menos profundas de torpor durante el periodo de hibernación; así que machos y hembras deben contar con mecanismos precisos que favorecen la sobrevivencia de los espermatozoides y mantienen su capacidad fertilizadora durante un tiempo de alrededor de cinco meses, permitiendo con ello,

que la gestación y la lactancia, procesos altamente demandantes de energía para las hembras, se realicen durante la temporada de primavera-verano, cuando las condiciones climáticas y la disponibilidad de alimento son favorables (López-Wilchis, 1989; León-Galván *et al.*, 2005).

Corynorhinus mexicanus cuenta con un ciclo reproductivo anual, presenta un patrón reproductivo de tipo asincrónico. La espermatogénesis reinicia en la primavera y llega a ser completa en el verano, coincidiendo con la temperatura ambiental alta y el periodo de máxima precipitación pluvial para la zona de estudio (León-Galván *et al.*, 2005).

En el mes de agosto, el crecimiento testicular es de alrededor de 40 veces mayor en relación con el peso correspondiente a la época de inactividad de la espermatogénesis (de noviembre a abril); de septiembre a noviembre hay regresión testicular. Finalmente, los apareamientos, se llevan a cabo en coincidencia con la fase de inactividad espermatogénica, por parte de los testículos; lo que implica un desfasamiento de las funciones sexuales masculinas para la especie, sustentado en un inusual almacenamiento prolongado de espermatozoides en la cola del epidídimo de los individuos (León-Galván *et al.*, 2005; Cervantes *et al.*, 2008).

León-Galván *et al.*, 2005 mostraron que existe un desfasamiento temporal en el reinicio del crecimiento de los diferentes órganos sexuales, evidente por el cambio de tamaño y peso, en el periodo noviembre-abril se registraron los valores más bajos; presentaron cambios mensuales durante el ciclo anual. Encontraron que en relación

al compartimiento intersticial, se registro un valor promedio de células intersticiales/sección histológica, pero no presentó fluctuaciones marcadas a lo largo del ciclo anual, aunque no se diferenciaron los tipos de células que se contabilizaron (León-Galván, 2008).

La información obtenida sobre la posición anatómica, la apariencia y las medidas de los órganos sexuales masculinos de los murciélagos *Corynorhinus mexicanus*, permitieron determinar las condiciones reproductivas (espermatogénesis, almacenamiento, apareamiento e inactividad), a través del ciclo anual, gracias a esta información se procederá a continuar con el estudio de la reproducción de esta especie, ampliando el conocimiento en relación a la interacción entre los factores externos e internos de acuerdo a las variaciones estacionales y su relación al patrón reproductivo asincrónico de una especie endémica de México.

1.2. Factores que participan en la regulación de la reproducción

Los factores externos como la disponibilidad de alimento, la temperatura, el fotoperiodo y la precipitación, son responsables de los diferentes patrones reproductivos estacionales, pero han recibido relativamente poca atención (Heideman, 2000; Racey y Entwistle, 2000).

Cuando los factores externos e internos se encuentran en condiciones óptimas se presenta un éxito reproductivo en los murciélagos y, en general, la espermatogénesis, coincide con la época de verano en algunas especies donde los factores han aumentado sin ser extremos (Racey, 1982).

1.2.1. Factores externos:

Fotoperiodo

El fotoperiodo influye en la fisiología reproductiva de los murciélagos de zonas templadas, y en los machos afecta el peso testicular. Beasley y Zucker, 1984 compararon los efectos del fotoperiodo en condiciones naturales y de laboratorio, en la especie *Antrouzous pallidus*. Esta especie presenta un patrón estacional asincrónico, en el laboratorio se colocó a ejemplares de esta especie bajo condiciones de 14 horas luz-10 oscuridad (días largos) y 14 horas oscuridad -10 luz (días cortos), a 24 °C y los alimentaron con larvas, como resultado encontraron una relación del peso de los testículos a mayor número de horas luz (días largos), en comparación cuando hay menor número de horas luz, condiciones bajo las cuales se detiene la actividad espermatogénica.

Para entender la regulación neuroendocrina, es necesario revisar la vía retino-hipotálamo-pineal, la cual inicia cuando un estímulo lumínico que activa a los fotorreceptores de la retina, se transmite al núcleo supraquiasmático, a través del nervio óptico llegando al núcleo paraventricular. La información fótica es retransmitida por las células intermedio lateral de la médula espinal superior y luego al ganglio cervical superior, y la inervación postganglionar de la glándula pineal que regula la síntesis de melatonina. La melatonina es secretada en forma circadiana, mostrando niveles altos durante la noche y la secreción basal durante el día. La oscuridad promueve la secreción de noradrenalina por el ganglio cervical superior, la

acción de está en la glándula pineal, origina mayor producción de AMPc, aumenta la incorporación de triptofano, induce la activación catalítica de la N-acetiltransferasa y de la hidroxindol-O-metiltransferasa, y en consecuencia la síntesis y liberación de melatonina. La variación en el día aumenta o disminuye la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa de estradiol, lo que modifica la producción de pulsos de GnRH, alterándose la frecuencia de secreción de LH. La duración del día es la señal primaria para la eliminación de la actividad reproductiva (Malpaux, 2006).

Entonces tanto la duración de la iluminación y la temperatura son dos de los factores del medio ambiente que pueden modificar la reproducción, no todas las especies tienen la misma sensibilidad a dichos factores. El fotoperiodo incide sobre la temperatura ambiente en una relación directa, si aumenta la duración de iluminación a la superficie terrestre aumenta la temperatura (Folch, 1984).

Temperatura

La temperatura corporal de cada especie se encuentra dentro de un margen más o menos estable, que por lo general corresponde a los 37°C. Los mamíferos se sirven de dos complejos mecanismos para lograr mantenerse alrededor de estos valores de temperatura: a) la regulación de los movimientos musculares involuntarios, y b) la activación y desactivación de los distintos procesos metabólicos (Bicego, *et al.*, 2007).

Las neuronas del centro hipotalámico anterior responden a los cambios de la temperatura, y como respuesta se ponen en marcha una serie de mecanismos encaminados a producir termólisis, inhibiéndose el centro hipotalámico posterior, lo que origina mecanismos termogénicos, disminuyendo el metabolismo, el tono muscular y de forma progresiva la producción de hormona tiroidea. Con respuestas del organismo como el temblor muscular y la erección del pelo se incrementan la capacidad aislante, y se suman a la regulación de los niveles de actividad metabólica. A medida que aumenta la temperatura, la respiración se hace más rápida, permitiendo el mayor intercambio de gases, descendiendo entonces la temperatura. La vasodilatación de los capilares periféricos tiene lugar cuando aumenta la temperatura ambiental y la sudoración dará enfriamiento a la piel.

La vía principal de los impulsos que implican producción y pérdida de calor llegan al hipotálamo lateral, de ahí a la porción media cerebral, el tegumento pontino, la formación reticular, la médula y desde las fibras simpáticas a los vasos cutáneos, glándulas sudoríparas y fibras motoras musculares (Bicego, *et al.*, 2007).

Existe poca información sobre los efectos de las altas temperaturas sobre mamíferos silvestres en hábitats naturales con respecto a su reproducción (Bronson y Heideman, 1994). Es conocido que, los testículos requieren de una temperatura particular para poder llevar a cabo la producción de espermatozoides, entonces la temperatura influye en la reproducción, que implica un gasto energético para los mamíferos (Morgentaler, *et al.*, 1999).

Mantenerse en valores altos de temperatura tiene importantes implicaciones al causar esterilidad del macho y la anticoncepción. La temperatura del cuerpo está influenciada por la temperatura ambiente, en particular el testículo tiene una temperatura más baja que la temperatura corporal, esto se logra por diferentes formas, una de ellas es el escroto, que es una adaptación evolutiva para algunos mamíferos, y cuya función es alejar al testículo del cuerpo y exponerlo a una temperatura más baja respecto a la temperatura interna corporal.

También la temperatura regula la disponibilidad de alimento, dependiendo de la temporada del año como en otoño e invierno la disponibilidad de alimento es limitada, ya que existe una reducción de la temperatura. La reproducción, es un fenómeno complejo, conformado por varios procesos (Bumrungsri, *et al.*, 2006). En *Corynorhinus mexicanus* parte de la reproducción se lleva a cabo en la etapa otoñal invernal (apareamientos); en donde la etapa más costosa que es la espermatogénesis se lleva a cabo en el verano (León-Galván, 2008).

Gustafson y Damassa (1985), compararon en *Myotis lucifugus lucifugus* el efecto de dos temperaturas (4° y 40°C) sobre el peso del testículo y epidídimo, los animales fueron mantenidos en laboratorio siempre bajo condiciones de días cortos. Estos autores encontraron que a 40°C, los órganos reproductores alcanzaron mayor peso, asimismo, la concentración de testosterona en plasma fue mayor a esta temperatura. Por lo que concluyeron que hubo una relación positiva de la temperatura y la concentración de la testosterona con el peso (Speakman y Rohlf, 1986).

Precipitación

La precipitación y la temperatura se correlacionan negativamente dependiendo de la zona climática (Tieleman *et al.*, 2003). La precipitación puede influir en las actividades de los murciélagos y directamente en su supervivencia, por la humedad en la piel del murciélago, interfiere con la capacidad de ecolocación, en consecuencia, la capacidad de detectar a sus presas. También la precipitación impide volar a muchos insectos, haciéndolos inutilizables para la mayoría de los murciélagos. La precipitación puede actuar de manera directa, o de manera indirecta causando el crecimiento de la vegetación, lo que provoca un aumento en el suplemento nutricional (Burles, *et al.*, 2009).

Alimento

La alimentación es esencial para la reproducción, sobre todo hay más requerimiento en la gestación y mayormente en la lactación, que directamente dirige el crecimiento del infante antes del destete. En algunos mamíferos los nacimientos se dan en primavera o verano cuando el alimento está disponible. En los machos se requiere de la disponibilidad del alimento para el comportamiento reproductivo, particularmente en la actividad espermatogénica, que es un gasto energético (Goodman, 1999).

El alimento puede modular el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, la restricción del alimento en los adultos tiene efectos en las hormonas reproductivas y en la conducta. Cuando se induce el ayuno se suprime la LH y FSH, que es consecuencia de la reducción de la liberación de GnRH. La hormona derivada de los adipositos, la

leptina, refleja el estado de nutrición y reservas energéticas, sirve como una puerta metabólica del sistema reproductivo. Las leptinas estimulan la actividad reproductiva del sistema endocrino e induce la actividad reproductiva en ambos sexos. Las leptinas aparentemente pueden actuar directamente como señal inhibitoria para la esteroidogénesis testicular, que puede ser relevante para explicar el enlace entre decremento de la secreción de testosterona e hiperleptinemia en hombres obesos. (Cunningham, *et al.*, 1999; Tena-Sempere y Barreiro, 2002). Esto sucede en el murciélago macho *Scotophilus heathi*, en donde los efectos de la actividad inhibitoria y estimuladora del testículo dependen de los niveles circulantes de leptina, regula la esteroidogénesis testicular (Roy y Krishna, 2010).

Los murciélagos invierten en la captura una importante cantidad de energía, así como en mantener procesos fisiológicos fundamentales en su patrón reproductivo, principalmente en la espermatogénesis, necesitan del verano para obtener el mayor alimento, pero durante la temporada fría del año, la disminución en la cantidad de alimento disponible para los murciélagos, implica un déficit de energía para continuar sustentando el proceso de la espermatogénesis que es costoso energéticamente. De manera que varias especies de murciélagos que habitan en zonas templadas y frías contienden con las bajas temperaturas y la escasez de alimento realizando una conducta de aletargamiento fisiológico, suspendiendo aquellos procesos que son costosos energéticamente como lo es la producción de espermatozoides, pero continúan con otros procesos reproductivos al parecer menos costosos

energéticamente como lo es el almacenamiento epididimario de espermatozoides y finalmente el apareamiento (León-Galván *et al.*, 2005).

1.2.2. Factores internos que regulan la reproducción

En los murciélagos, como en todos los mamíferos estudiados, la actividad de espermatogénesis está regulada por la hipófisis. El hipotálamo controla las hormonas hipofisarias (gonadotrofinas), que desempeñan un papel fundamental en la coordinación de las actividades reproductivas en respuesta a los cambios fisiológicos y a las condiciones ambientales (Anthony, 2000).

La regulación endocrina de la espermatogénesis, se realiza por interacciones entre el hipotálamo, la hipófisis y el testículo. La producción de espermatozoides depende de una estimulación por las gonadotrofinas como: la hormona luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH), que se secretan en el torrente sanguíneo de la hipófisis anterior en respuesta a la GnRH hipotalámica. LH actúa sobre las células de Leydig en los testículos para producir esteroides, principalmente testosterona (T), que pueden ser aromatizados a estradiol (E2). Mientras que la T y E2 tienen efectos locales sobre la espermatogénesis, estos esteroides también tienen un efecto de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo (a través de controlar la secreción de GnRH) y la glándula hipofisaria limita la secreción de LH y FSH (en esteroides el efecto negativo de retroalimentación sobre la FSH varía entre las especies). FSH estimula Células de Sertoli para apoyar la espermatogénesis. En respuesta a la FSH, el epitelio seminífero produce la inhibina B, lo cual repercute en la hipófisis

suprimiendo la producción de FSH (Leblond y Clermont, 1952; Andersson, *et al.*, 2003).

FSH también puede estar implicada en la regulación del número de células de Leydig, la capacidad androgénica y en la mediación de la maduración de las células de Leydig (Kerr y Sharpe, 1985).

En murciélagos rinolofidos y vespertilionidos se ha visto que las neuronas de la GnRH se encuentran en el hipotálamo medio basal en la región del núcleo arqueado. Se encontró en algunos murciélagos como: *Myotis licifugus*, *M. macrodactylu*, *Miniopterus shreibersii* y *Eptesicus fuscus* (Kawamoto, 2003).

Numerosos autores (Gustafson, 1979) han descrito los cambios estacionales en la morfología de las células de Leydig y/o la actividad secretora que indican la presencia de dos factores de la actividad de las células de Leydig. En la primera, las células de Leydig son activas durante la espermatogénesis y permanecen activas durante la hibernación (patrón *Pipistrellus*); mientras que en el segundo las células de Leydig son activas durante la espermatogénesis, pero se inactivan durante la hibernación (patrón *Myotis*) (Bernand, 1986).

2. JUSTIFICACIÓN

Existen pocos datos acerca de la relación de la temperatura, fotoperiodo y la testosterona con el patrón reproductor estacional en vertebrados existe poca información: con *Rana perezi* (Delgado, *et al.*, 1989), *Calotes versicolor* (Shanbhag, *et al.*, 2000); *Pimephales promelas*, (Pawlowski, *et al.*, 2004), *Oncorhynchus mikiss*

(Taylor, *et al.*, 2008). En mamíferos y en particular en el orden Chiroptera esta temática no ha sido abordada.

Los murciélagos insectívoros tienen una gran importancia ecológica como controladores de plagas, que impactan a la economía agrícola de un país (Ceballos y Oliva, 2005). En particular, para las zonas templadas de diferentes partes del mundo, durante el verano, el tamaño de las poblaciones de insectos de los cuales se alimentan los murciélagos aumenta paralelamente con la temperatura ambiente. *Corynorhinus mexicanus* es un murciélago endémico de México, con un ciclo reproductor anual estacional y presenta un patrón con asincronía entre la espermatogénesis y el apareamiento (León-Galván, *et al.*, 2005). Este patrón reproductor se asemeja en términos generales, al descrito para otros murciélagos plecotínidos de zonas frías con los que se encuentra filogenéticamente relacionado, tal es el caso de *C. townsendii* y *C. rafinesquii* (Piaggio y Perkins, 2005). Por tanto, este trabajo aporta información sobre la especie y a su vez a nivel de la Tribu: Plecotini que forman parte de las especies mencionadas. Existe muy poca información con respecto al control endocrino de la reproducción masculina y en particular a la asincronía entre la actividad de los órganos reproductores primarios y secundarios que muestran los murciélagos que se encuentran en torpor (Bernard, 1986). Lo que genera innumerables preguntas acerca de los procesos involucrados en su control y regulación; que son afectados por diferentes factores, tanto externos (fotoperiodo, temperatura, disponibilidad de alimento, entre otros) como internos (principalmente neuroendocrinos) (Bronson y Heideman, 1994).

Existen varias especies de murciélagos, pertenecientes a las familias Vespertilionidae y Rhinolophidae, que presentan un patrón masculino temporalmente asincrónico. Diversos investigadores han realizado estudios para entender los mecanismos de regulación y el papel que juegan diversos factores externos, (como la temperatura ambiental y el fotoperiodo) con el patrón reproductivo, las especies de murciélagos que lo presentan pueden contender con las condiciones adversas del ambiente durante la temporada fría del año y lograr perpetuar su especie. Aún falta información que permita dilucidar aspectos del testículo como órgano endócrino durante el periodo de inactividad espermatogénica, aunque en ese periodo se está llevando a cabo las otras funciones complementarias como el apareamiento, mantenimiento de los espermatozoides viables en el epidídimo y la conformación del fluido seminal por parte de las glándulas sexuales accesorias. Es por ello, que este trabajo está enfocado a contribuir con una especie que tiene una enorme importancia ecológica por el número de especies que lo conforman, el tamaño grande de sus poblaciones y por su papel en las tramas tróficas.

3. OBJETIVO

Determinar si existe una relación entre el número de células de Leydig de *Corynorhinus mexicanus*, productoras de testosterona, el fotoperiodo y la temperatura con el patrón reproductivo.

3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar las variaciones en la temperatura superficial: corporal y escrotal (testicular y epididimaria), en función de las diferentes condiciones reproductivas de los ejemplares de *C. mexicanus* a lo largo del ciclo reproductivo anual.
- Estudiar los cambios mensuales en la temperatura media ambiental y el fotoperiodo externo e interno del Túnel de la Sierra de Tlaxco, Tlaxcala.
- Determinar el volumen testicular de los ejemplares machos colectados.
- Analizar las variaciones en el contenido de testosterona intratesticular con base en criterios morfológicos, morfométricos y de inmunomarcaje de testosterona de las células de Leydig, en diferentes murciélagos de las principales etapas de su ciclo reproductivo
- Relacionar las temperaturas superficiales, ambiental, fotoperiodo, número e inmunomarcaje de células productoras de testosterona con el patrón reproductivo.

4. HIPÓTESIS

El número y actividad de las células de Leydig productoras de testosterona, el fotoperiodo y la temperatura, se relacionan directamente con el patrón reproductivo asincrónico del murciélago macho *Corynorhinus mexicanus*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Trabajo de campo

Los ejemplares de *Corynorhinus mexicanus* empleados para este trabajo se obtuvieron de 12 colectas mensuales, durante el 2010. Los animales provienen del refugio llamado el "Túnel" localizado a 10km E de Tlaxco, Tlaxcala (19°37'14"N, 98°02'02"W; 3220 msnm). Cada mes fueron capturados de 2 a 3 machos adultos, con redes de niebla colocadas en la entrada del refugio justo antes de que los animales salieran a forrajear o con redes de golpe, dentro del refugio cuando éstos se encontraban dormidos durante el día. Una vez que se determinó la condición adulta de los ejemplares atrapados, a partir del criterio de osificación completa de las placas de crecimiento cartilaginosa epifisial en la unión metacarpo-falangeal del 3er dedo (Anthony, 1988), se registró su condición reproductiva (tamaño y apariencia de los testículos y epidídimos) (León-Galván, *et al.*, 2005; León-Galván, 2008). Los ejemplares que cumplieron con el criterio de edad adulta fueron seleccionados y transportados a las instalaciones de la UAM-Iztapalapa, donde permanecieron vivos de 12 a 18 horas, previo a la disección.

Los murciélagos seleccionados se agruparon de acuerdo a la fecha de su captura y de acuerdo a los principales procesos que conforman las etapas del patrón reproductivo de la especie (León-Galván, *et al.*, 2005; León-Galván, 2008). Estos grupos fueron: (A) inactividad sexual, Febrero-Abril, (B) espermatogénesis, Mayo-Agosto, (C) almacenamiento epididimario de espermatozoides, Septiembre-Octubre y (D) apareamiento, Noviembre-Enero.

La determinación taxonómica específica de los ejemplares estudiados se corroboró con las características descritas por Tumlinson (1992) y por la guía de identificación (Medellín, *et al.*, 2008).

5.2. Registro de la temperatura (ambiental, corporal y escrotal).

La temperatura ambiental interna del refugio, corporal y escrotal fue registrada con sensores de temperatura externos (Data logger de la familia HOBO H8 de Onset Computer Corporation) con precisión $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Los HOBOS fueron programados para registrar cada 20 segundos la temperatura, la cual se registro durante 1 minuto tanto para el murciélago como para el ambiente.

A cada murciélago capturado se le colocaron sensores directamente en: (a) región del pecho para registrar la temperatura corporal, (b) en el testículo y (c) en el epidídimo; Otro sensor fue colocado a 20cm de distancia del murciélago para registrar la temperatura ambiente al momento del registro de las temperaturas del individuo. Los murciélagos fueron capturados durante el día, cuando estaban en reposo (en torpor, dormidos solitarios y en grupo dependiendo de la fecha del año), entre las 13:00 y las 15:00 hrs, de 6 a 34 individuos.

Para evaluar las variaciones de la temperatura ambiental de la zona donde se encuentra el refugio, se obtuvieron de la estación meteorológica de la Sierra de Tlaxco, Tlaxcala.

5.3. Registro del fotoperiodo

La intensidad luminosa (en lumens) en la zona externa de la cueva fue medida con 4 Datta loggers (HOBO H8, Onset Computer Corporation), con una precisión de, ± 0.2 lux. Los HOBOs fueron programados para registrar la luminosidad cada media hora desde junio del 2009 a junio del 2010. Los HOBOs fueron colocados alrededor del túnel a 20 metros de altura sobre un Oyamel (Abies), para capturar la luminosidad del sol con la menor interferencia de la vegetación. Las variaciones de intensidad luminosa fueron transformadas a “número de horas luz durante un ciclo de 24 horas”.

5.4. Estudio anatómico e histológico del testículo.

Los 24 murciélagos empleados para el estudio anatómico e histológico de los testículos animales se sacrificaron de acuerdo con la Ley de protección a los animales del distrito federal (gaceta oficial del distrito federal, 2002) y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1995). La eutanasia se realizó mediante una anestesia con éter y posterior decapitación, inmediatamente después de la muerte, se registró la posición y apariencia de los órganos sexuales, el tracto reproductor completo fue extraído con ayuda de un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, Mx 475002). El diámetro mayor y menor, de cada testículo fue medido con un vernier Scala con una precisión de $\pm 0.1\text{mm}$. Estos datos se utilizaron para calcular el volumen testicular, con la fórmula el volumen de un cuerpo elipsoide que fue empleada por Lidicker, 1973; Kruttsch, *et al.*, 1990:

$$V=.523lw$$

Donde:

l = longitud del testículo

w = anchura del testículo.

El testículo derecho de cada murciélago se fijó en paraformaldehído al 4 % en solución amortiguadora de fosfatos (0.16 M, pH 7.4), a temperatura ambiente, donde permanecieron 18 horas, hasta su procesamiento y posterior análisis con microscopía de luz: de campo claro y confocal de barrido laser.

Los testículos de los murciélagos, se deshidrataron con soluciones de etanol de concentración gradual (50° a 100°gl), se aclararon con xileno e incluyeron con parafina paraplast plus tissue (McCormick scientific). Se obtuvieron 4 cortes longitudinales, de la porción media del testículo, seriados de 5 μ de espesor, en un micrótomo de rotación (Leica, Mx Rm 820). Las secciones histológicas se montaron en portaobjetos recubiertos con gelatina microbiológica (MERCK).

Las secciones histológicas fueron teñidas con hematoxilina-eosina "H-E" (Presnell, *et al.* 1997) (Anexo A) y montadas con Entellan y analizadas al microscopio de campo claro Axioskop II (Carl Zeiss). Fueron revisados dos cortes completos de cada testículo de las diferentes laminillas, en dirección cráneo-caudal y se digitalizó cada uno de los campos con una cámara AxioCam MRc5 (Carl Zeiss), hasta tener representada con imágenes la sección completa. De cada fotomicrografía, se realizó el conteo de células de Leydig, su longitud mayor y menor, el área del testículo, empleando el programa AxioVision 4.8 (Carl Zeiss). Todas las fotomicrografías

analizadas fueron tomadas con los objetivos de 1.25 y 40X. Se calculó el número promedio de las células, la longitud y el área de los testículos de las 4 etapas. Para obtener la densidad por unidad de área se obtuvo dividiendo el área del testículo entre el número de células de Leydig.

5.5. Inmunohistoquímica para la detección de testosterona.

Las secciones de tejido fueron desparafinadas con xileno, rehidratados con soluciones de concentración descendente de etanol, se bloquearon uniones inespecíficas en albumina sérica bovina, se incubó con el anticuerpo primario (antitestosterona de abcam, ab8557, dilución 1:50), y se empleo anticuerpo secundario rodaminado (Calbiochem, 401321; α 570-590nm) dilución 1:100 y se montó en un medio acuoso (DAKO) (anexo B). La presencia de células de Leydig inmunorreactivas a testosterona de los murciélagos *C. mexicanus* capturados en las diferentes etapas que se dividió el ciclo reproductivo anual de la especie, fueron detectadas en el espacio intersticial del testículo mediante la observación por microscopia de fluorescencia de un microscopio confocal láser de barrido (Carl Zeiss). Se obtuvieron 576 fotomicrografías de 48 laminillas (12 laminillas/4 etapas de estudio) en un microscopio confocal de barrido láser para analizar semi-cuantitativamente la presencia de testosterona de cada fotomicrografía con el objetivo de 20X. Se realizaron 5 mediciones con el programa ImageJ (Versión 1.46 c, 2004) de la densidad óptica en las células de Leydig, mediante una barra de calibración donde el valor de 2.6 es rojo y cero es blanco, entre más se acerca al rojo mayor la producción de testosterona.

5.6. Análisis estadístico

Con los datos de temperatura se elaboro una matriz que fue usada para analizar las variaciones de la temperaturas entre los cuatro estados fenológicos (considerados: Inactivos, espermatogénesis, almacenamiento espermático y apareamiento), a través de un análisis de varianza utilizando el programa Stata 7, fueron analizados mediante la prueba de ANDEVA (Stata Corp., 2001). Para evaluar la variación de la temperatura ambiente (externa y del interior del refugio) y temperatura superficial de los individuos (corporal, testicular y epididimaria), y su relación respecto a los diferentes tipos de condición fisiológica (simplemente si estaban en torpor, dormidos ya sea solitarios y en grupo), en la que se encontraban los murciélagos al momento de su captura así como en relación a los distintos grupos de estudio, que se refiere a las diferentes etapas del ciclo reproductivo para la especie (en espermatogénesis, almacenamiento epididimario de espermatozoides y apareamiento: así como en la etapa de inactividad reproductiva).

Posteriormente los datos del fotoperiodo fueron agrupados y promediados por semana, para entonces elaborar el gráfico correspondiente a la variación del fotoperiodo a lo largo de un ciclo anual. Esta información fue correlacionada con las etapas reproductivas de los murciélagos, para lo cual se empleó un análisis de varianza (ANDEVA, Stata Corp, 2001).

Las variables como: volumen testicular, número de células de Leydig, densidad por unidad de área, diámetro mayor y menor de las células de Leydig y la densidad óptica, fueron analizadas con el programa NCSS 2004/GESS 2006, con la prueba de

ANOVA y Kruskal Wallis. Para observar la relación que hay entre la temperatura, el fotoperiodo y la densidad óptica de testosterona, se realizó una correlación con el programa NCSS 2004/GESS 2006, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ (Sokal y Rohlf, 1995).

6. RESULTADOS

Se colectaron un total de 24 murciélagos, 6 en cada una de las etapas del ciclo reproductor (inactividad, espermatogénesis, almacenamiento y apareamiento).

6.1. Registro de datos de temperatura (ambiental, corporal y escrotal) y fotoperiodo

La temperatura ambiente de interior del refugio de los murciélagos de *C. mexicanus* (fig. 1), presenta una fluctuación durante un ciclo anual, entre los 8° y 13°C. Los murciélagos que se encuentran en condición conductual de torpor y dormidos solitarios (fig. 2) presentan diferencias estadísticamente significativas que se muestran en letras diferentes (a, b y c). La temperatura corporal de los murciélagos fue mayor respecto al valor de la temperatura ambiental del sitio donde se encontraban perchados al momento de su captura. Cuando se encontraban: 1) en torpor la temperatura máxima fue de 13.9°C y la mínima de 10.3°C; 2) dormidos solitarios la máxima de 18.8°C y la mínima de 10.5°C; 3) dormidos en grupo la máxima de 25.2°C y la mínima de 21.1°C. Pero en los meses del año en los que los individuos se encontraban en torpor, la diferencia fue apenas de alrededor de 1°C, mientras que cuando los murciélagos no se encontraban en torpor, la diferencia de temperatura corporal respecto a la ambiental del refugio fue alrededor de 6°C.

Para el periodo de inactividad reproductiva la temperatura ambiental es menor que la temperatura corporal y está es menor a la temperatura del epidídimo, no hay temperatura testicular ya que este es muy pequeño. Para el periodo de espermatogénesis la temperatura ambiental es menor a la temperatura corporal por 15°C, y la temperatura corporal es mayor a la temperatura testicular es aproximadamente igual a la temperatura del epidídimo. Para la etapa de almacenamiento epididimario de espermatozoides, la temperatura ambiente es menor que la temperatura corporal, en todas las condiciones. Para la condición de torpor, la temperatura corporal es similar a la temperatura testicular y esta a su vez es similar a la temperatura del epidídimo; en la condición de dormido solitario, la temperatura corporal es mayor a la temperatura testicular, siendo similar a la temperatura del epidídimo; y en la condición de dormido en grupo la temperatura corporal es menor que la temperatura del epidídimo (fig. 2).

Para la etapa de apareamiento la temperatura ambiental es menor a la temperatura corporal, en las diferentes condiciones reproductivas del murciélago; en la condición de letargo la temperatura corporal tiene un aumento gradual hasta llegar a la temperatura testicular y luego a temperatura epididimaria; en la condición de dormido solitario la temperatura corporal es similar a la temperatura epididimaria y en la condición de dormido en grupo la temperatura corporal es mayor a la temperatura epididimaria.

En las condiciones de torpor y de dormidos solitarios, la temperatura ambiente y la temperatura corporal son mayores en la etapa de almacenamiento espermático en el

epidídimo y la de menor valor fue en la etapa de inactividad reproductiva, en donde existe diferencia significativa entre las etapas mencionadas, pero también con la etapa de apareamiento. Como puede observarse en la figura 2 A y 2 B no hay datos de temperatura de los murciélagos en condición de torpor y dormidos solitarios durante la etapa de espermatogénesis, por que no se encontraron murciélagos, pero si cuando estos se encontraban en grupo. También puede notarse que en ciertas etapas del ciclo no se registraron temperaturas para los órganos reproductores (testículo y epidídimo), debido a que el órgano era demasiado pequeño que prácticamente no era posible observarlo externamente (fig. 2 A-C).

En la condición de dormidos en grupo la temperatura ambiental y la temperatura testicular presentan un valor mayor en la etapa de espermatogénesis y el valor menor en la etapa de apareamiento, presentando diferencias estadísticamente significativas (*) entre estas etapas y también con la etapa de almacenamiento espermático en el epidídimo (fig. 2C). La temperatura ambiente de la zona donde se encuentra el refugio, su máxima es 32.8°C, en el mes de abril y la mínima de -2.8, en el mes de enero (fig. 3).

La duración del fotoperiodo (equivalente al número de horas luz durante un día) fue mayor de mayo a agosto, cuando en la especie de estudio se encuentra en la etapa de de la espermatogénesis, en tanto que la disminución del fotoperiodo, la espermatogénesis cesa y los epidídimos se encuentran en su máximo desarrollo, con gran cantidad de espermatozoides almacenados, posteriormente, los murciélagos se

encuentran realizando los apareamientos y el fotoperiodo continúa en descenso (fig.4).

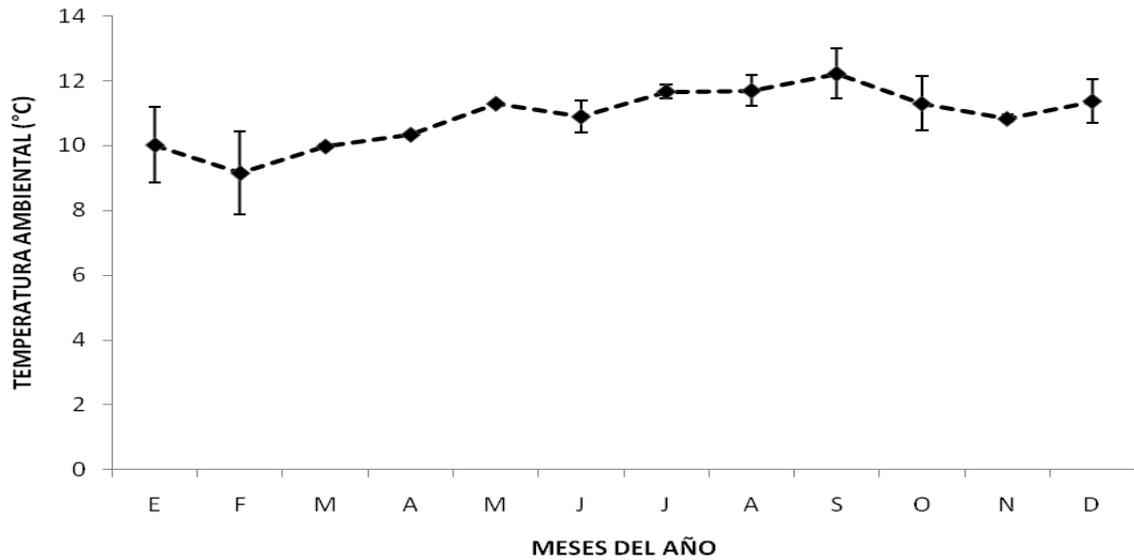
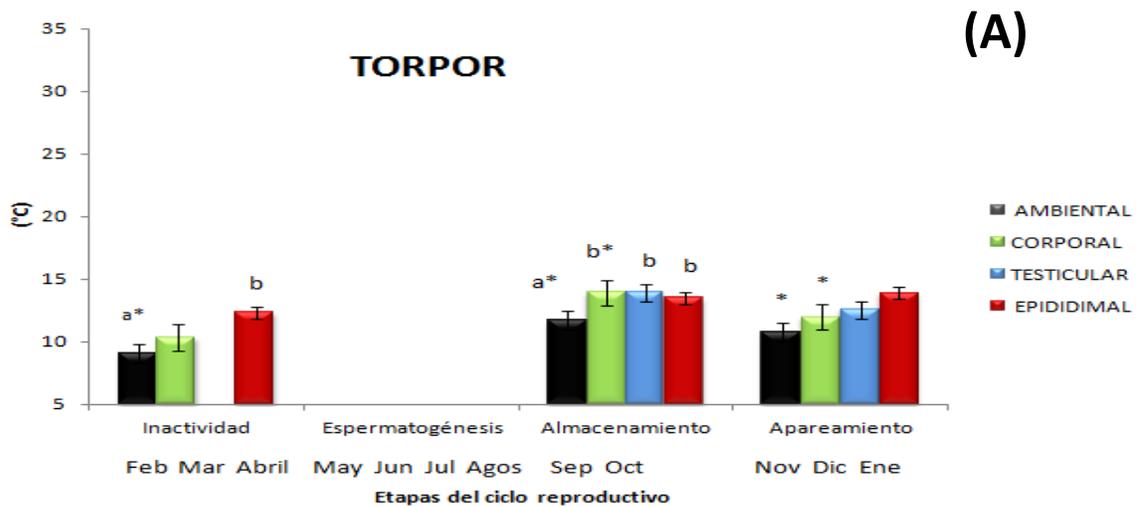


Figura 1. Variación promedio mensual en la temperatura ambiental para el interior del refugio “El Túnel”, a lo largo de un ciclo anual. Los puntos representan el valor promedio mensual \pm error estándar, los registros de temperatura fueron realizados entre las 13 y las 15 horas de 20 datos por mes.



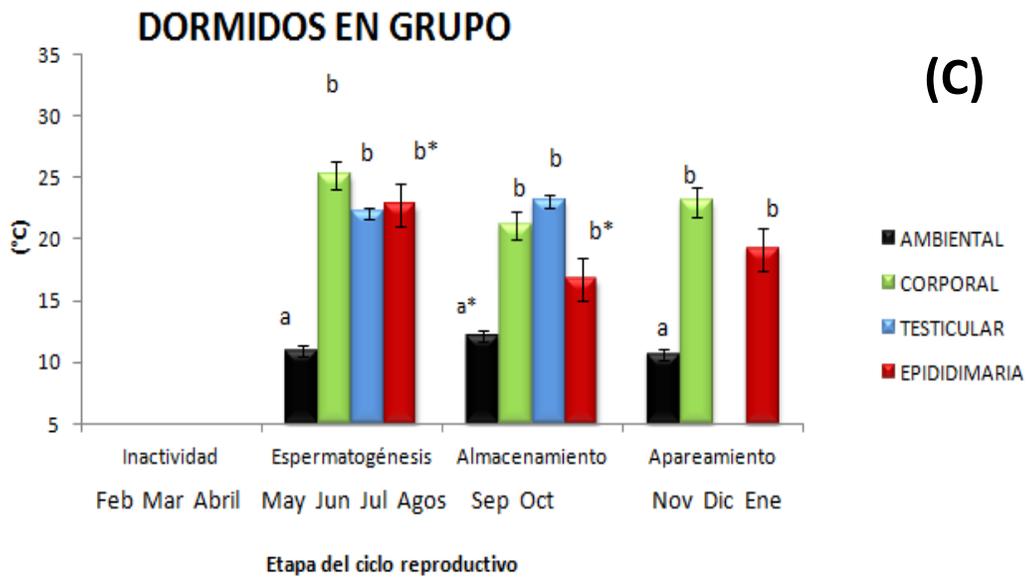
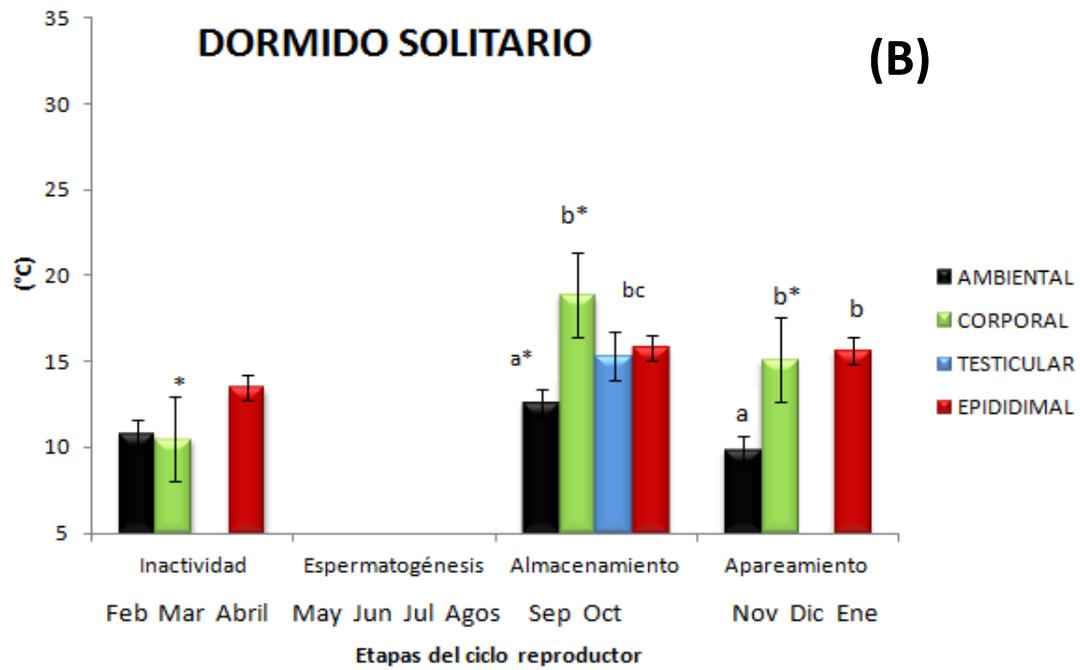


Figura 2. Comparación de las temperaturas superficiales del cuerpo y de los órganos sexuales (testículo y epidídimo) de los murciélagos *C. mexicanus* que se encontraban en

diferente condición conductual (A=torpor, B=dormido individual y C=en grupo) entre las diferentes etapas del ciclo reproductivo. Las barras representan la temperatura media registrada (n=5-25 murciélagos por cada etapa del ciclo), las barras de error son la desviación estándar. Letras diferentes ubicadas encima de cada barra indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas en comparación entre las diferentes temperaturas registradas dentro de cada etapa del ciclo reproductivo anual. El asterisco señala la existencia de diferencias significativas al comparar un mismo tipo de temperatura entre las diferentes etapas del ciclo reproductivo anual (ANDEVA, $p < 0.05$).

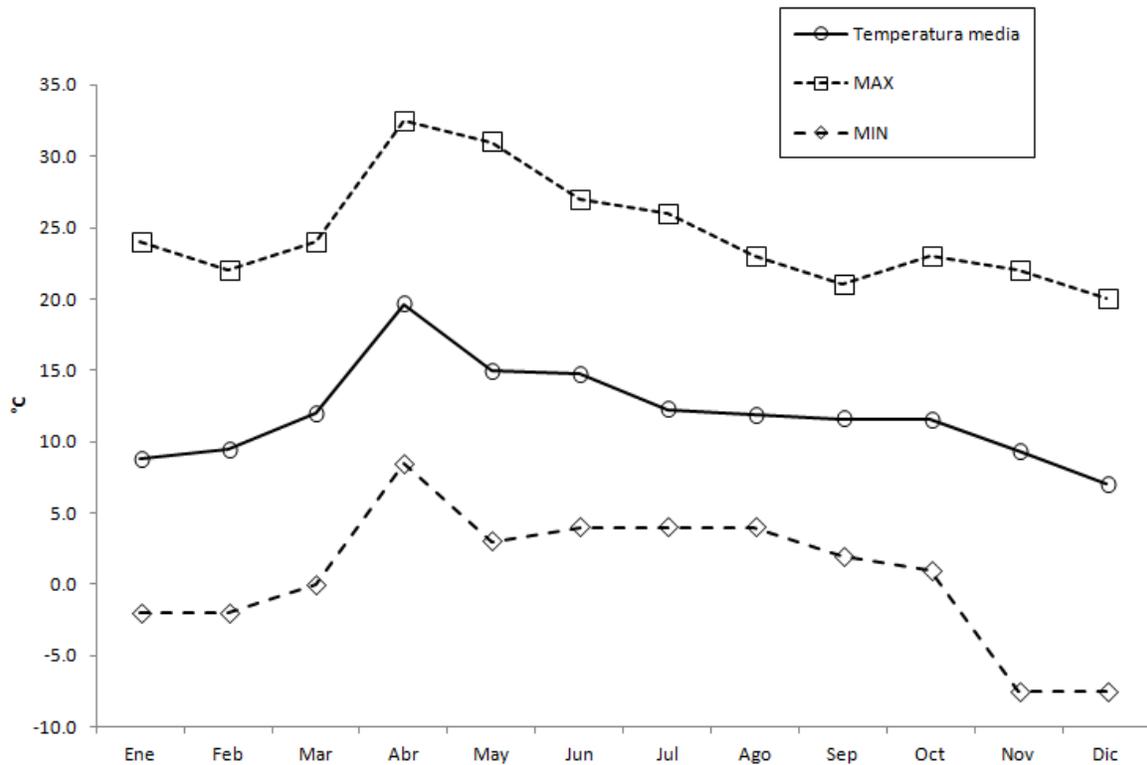


Figura 3. Variación en la temperatura media, máxima y mínima del exterior del refugio de la estación meteorológica de la Sierra de Tlaxco, Tlaxcala, durante un ciclo anual.

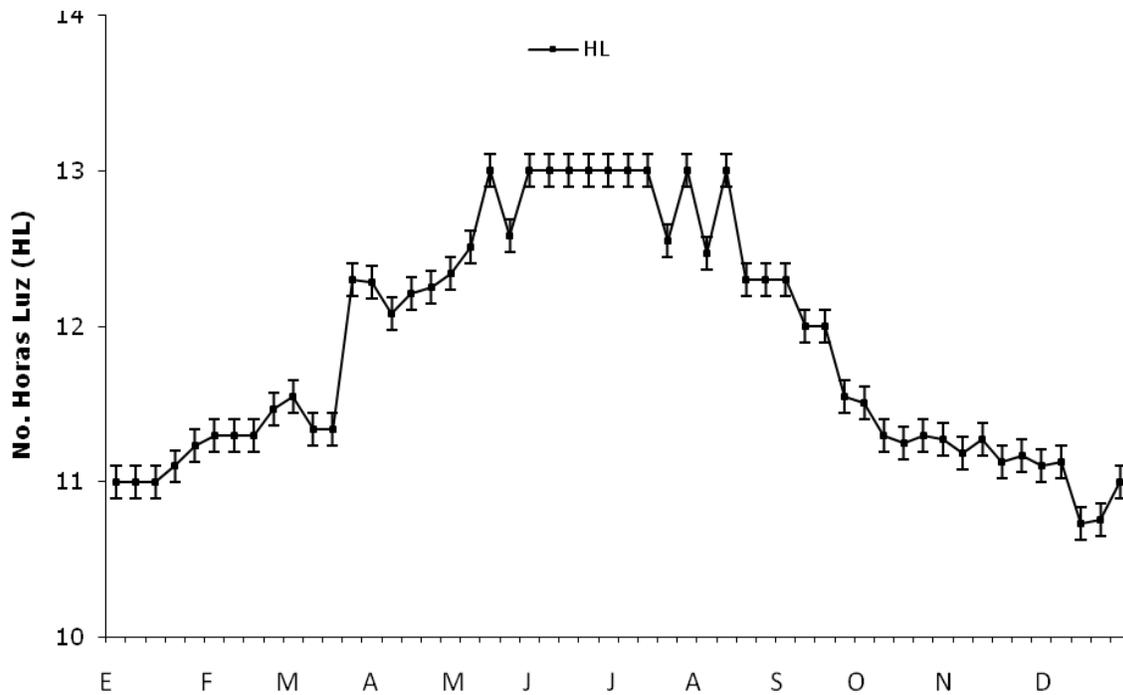


Figura 4. Variación promedio semanal mensual del fotoperiodo (número de horas luz por día) a lo largo del ciclo anual, \pm error estándar para la zona donde se localiza el refugio “El Túnel”, que es utilizado por los murciélagos de estudio.

6.2. Análisis de la anatomía e histología del testículo

El volumen de los testículos de los murciélagos *C. mexicanus* estudiados mostraron variaciones entre cada una de las etapas en las que se separó el ciclo reproductivo para la especie. En las etapas de apareamiento e inactividad reproductiva se registraron los valores más bajos del volumen testicular que fueron de 31mm^3 , mientras que en las etapas donde ocurre la espermatogénesis y almacenamiento epididimario de espermatozoides, el volumen testicular presentó valores más altos, que fueron de 164mm^3 (fig. 5).

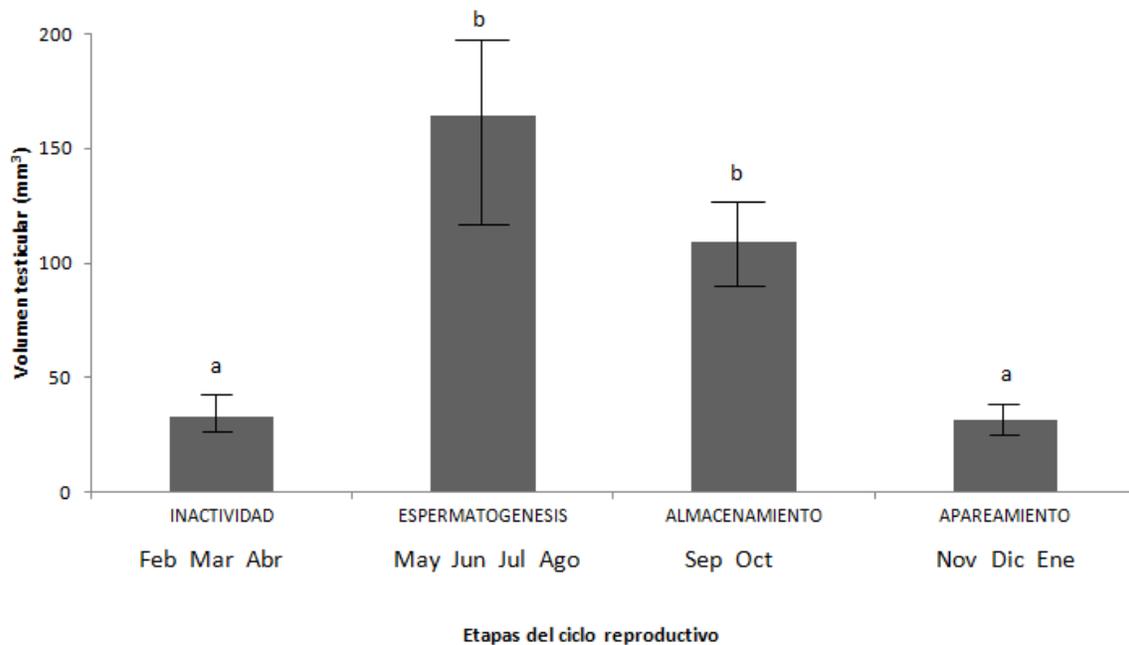


Figura 5. Variación del volumen testicular de los murciélagos *Corynorhinus mexicanus* en las diferentes etapas del ciclo reproductivo anual. Los valores representan el promedio de n=6 murciélagos por etapa, \pm desviación estándar. Letras (a, b), existe diferencia significativa con letras diferentes entre las etapas del ciclo reproductivo (Kruskal-wallis, $p < 0.05$).

El número total de células de Leydig por sección histológica completa del testículo y la longitud (mayor y menor) de éstas células, presentaron cambios durante las etapas del ciclo reproductivo. En términos generales, los valores respectivos para ambas variables analizadas fueron significativamente mayores ($F=6.13$, g. l. = 3, $p=0.024$) para los murciélagos capturados durante la etapa de espermatogénesis (mayo-agosto), en esta etapa se registraron los valores más altos del número total de células de Leydig, con un valor promedio de 3640.5 (± 1542.44) células/sección histológica del testículo (fig. 6); además la longitud mayor de las células presentó un valor promedio de 89.75 μm (fig. 7). Durante los meses de noviembre-enero

(apareamiento), el número de células de Leydig y su longitud disminuyeron, donde se presentaron los valores más bajos. La disminución gradual en las siguientes dos etapas, es decir durante el periodo de almacenamiento de espermatozoides y cuando se llevan a cabo los apareamientos, con un ligero repunte en la temporada inactiva de la reproducción, entre éstas tres etapas no se registraron diferencias significativas al aplicar la prueba de ANOVA (fig. 6 y 7). En cuanto a la densidad por unidad de área de las células de Leydig presenta un valor de 297.66mm^2 en la etapa de espermatogénesis, en almacenamiento con valor de 270.83mm^2 , en apareamiento con 251.66mm^2 e inactividad con un valor de 223.66mm^2 . Presentando diferencias significativas con la prueba de ANOVA (NCSS) la etapa de espermatogénesis con las demás etapas. En la figura 8 se presentan fotomicrografías de las secciones histológicas longitudinales de testículo de *C. mexicanus* representativas de cada una de las etapas del ciclo reproductivo anual, se observan cambios en el tamaño del testículo, de las células de Leydig y en el número de células de Leydig.

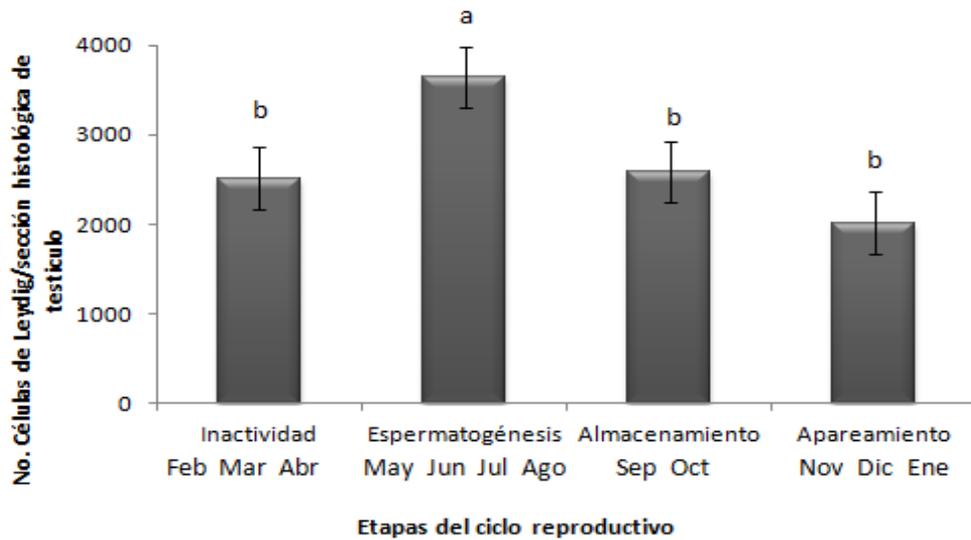


Figura 6. Variación del número de células de Leydig por sección histológica de testículo en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Se presentan valores promedio \pm el error estándar para los testículos de una $n=6$ murciélagos por etapa de estudio. El asterisco indica la etapa que presentó los valores significativamente más altos (ANOVA, $p<0.05$).

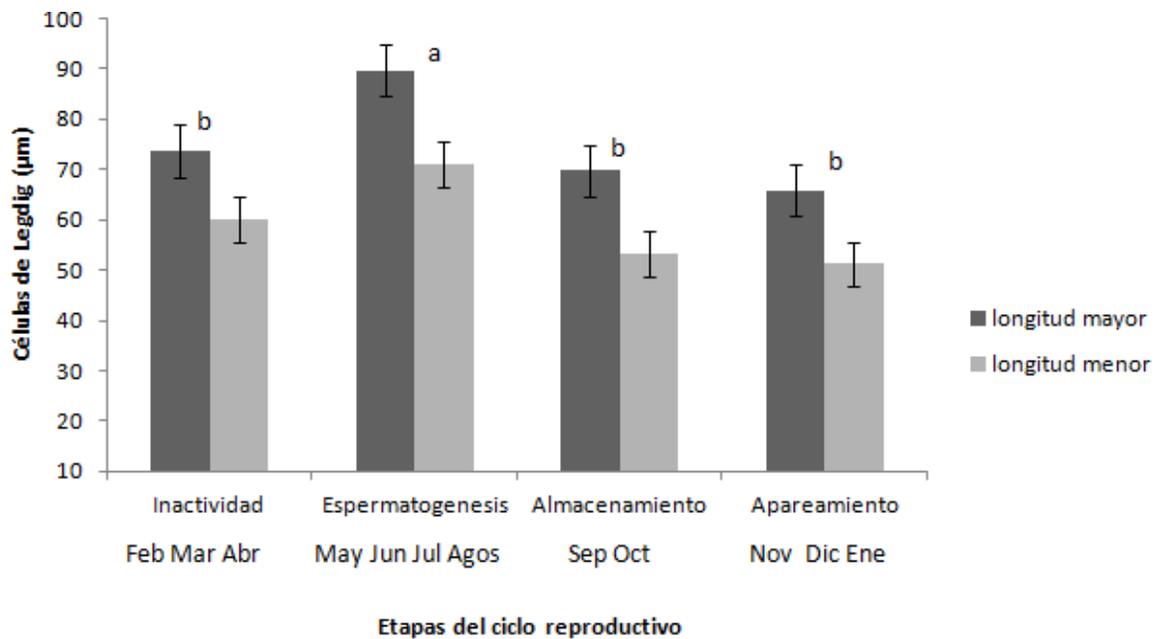


Figura 7. Longitud mayor y menor de las células de Leydig analizadas por sección histológica del testículo de murciélagos *Corynorhinus mexicanus*, en las diferentes etapas del ciclo

reproductivo. Se presentan valores promedio \pm el error estándar para los testículos analizados de una $n=6$ murciélagos por etapa de estudio. Letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre las etapas (ANOVA, $p<0.05$).

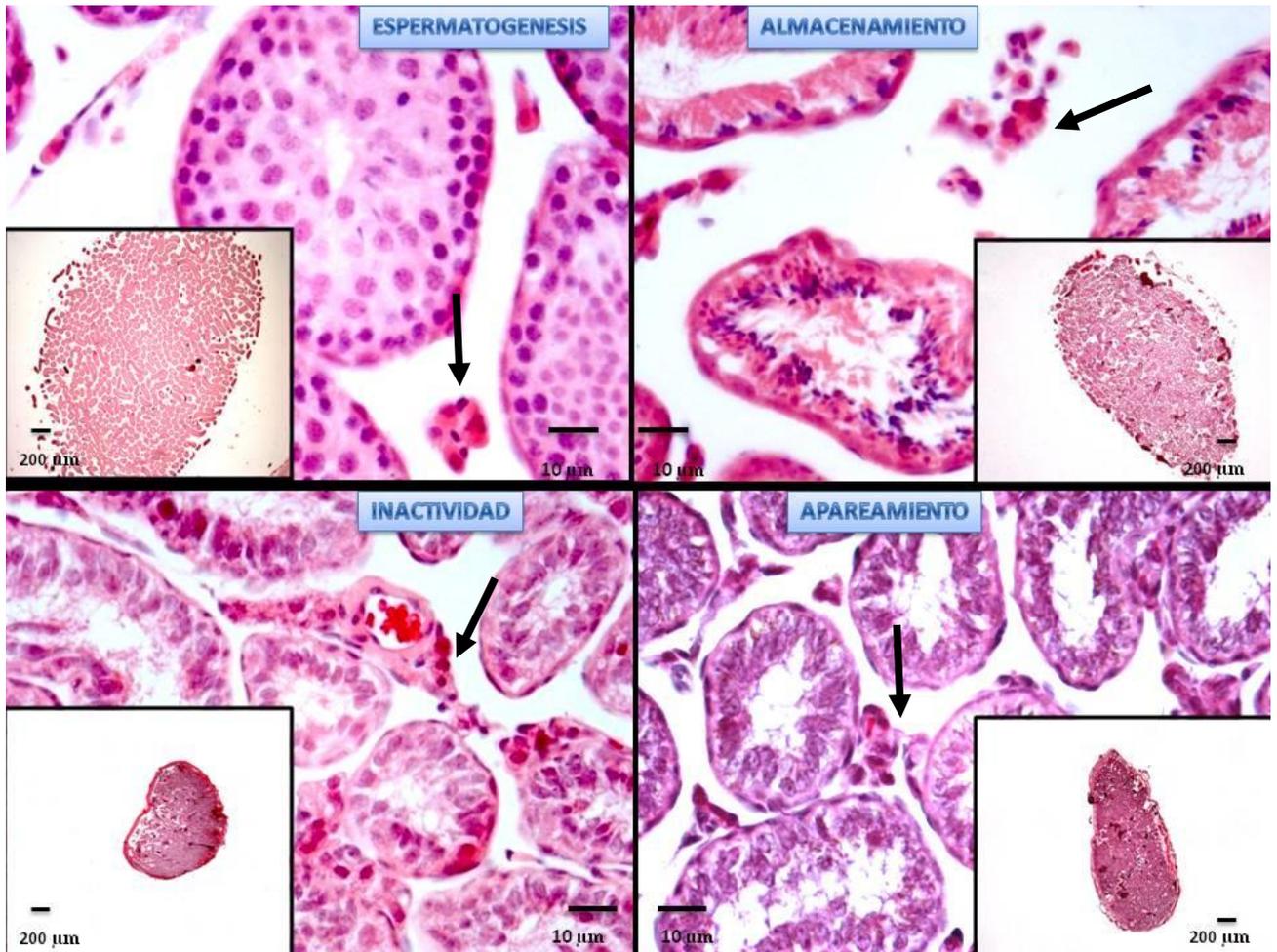


Figura 8. Fotomicrografías de secciones histológicas de testículos de murciélagos *C. mexicanus* en las diferentes etapas del ciclo reproductivo. Se pueden observar los cambios en el tamaño de los testículos y la disposición que tienen las células de Leydig en el espacio intersticial intertubular, así como los cambios más conspicuos en las características del epitelio seminífero. Las flechas señalan las células de Leydig con características morfológicas que sugieren producción de testosterona (H-E, aumento original principal X400, recuadro X12.5).

6.3. Análisis de la variación en el contenido de testosterona intratesticular.

El análisis densitométrico de las marcas fluorescentes (células de Leydig positivas a testosterona) que representa la intensidad luminosa emitida por dichas marcas y que por lo tanto, a mayor intensidad luminosa, habrá correspondientemente un mayor número de moléculas inmunoreactivas a testosterona que han sido marcadas y por lo tanto, presentes en el interior de las células de Leydig, indicando que en el periodo de espermatogénesis (mayo-agosto), es cuando mayor intensidad luminosa de las marcas fluorescentes se registraron en comparación con las otras tres etapas del estudio, mostrando diferencias significativas ($F= 5.12$, g.l.=3 y $p=0.036$). En las etapas de almacenamiento epididimario de espermatozoides (septiembre-octubre) y en la etapa de apareamiento (noviembre-enero) la intensidad de las marcas fluorescentes disminuyó gradualmente y ya en la etapa de inactividad reproductiva (febrero-abril), la intensidad luminosa fue entre un 40% y 50% menor en comparación con lo registrado para la etapa de espermatogénesis (figs. 9 y 10).

El análisis semi-cuantitativo muestra que la densidad óptica de la marca de testosterona muestra el siguiente gradiente: espermatogénesis (1.06) >almacenamiento> apareamiento > inactividad (0.50), también es importante mencionar la relación que existe entre la cantidad de células y la densidad óptica del marcaje de testosterona (fig.10).

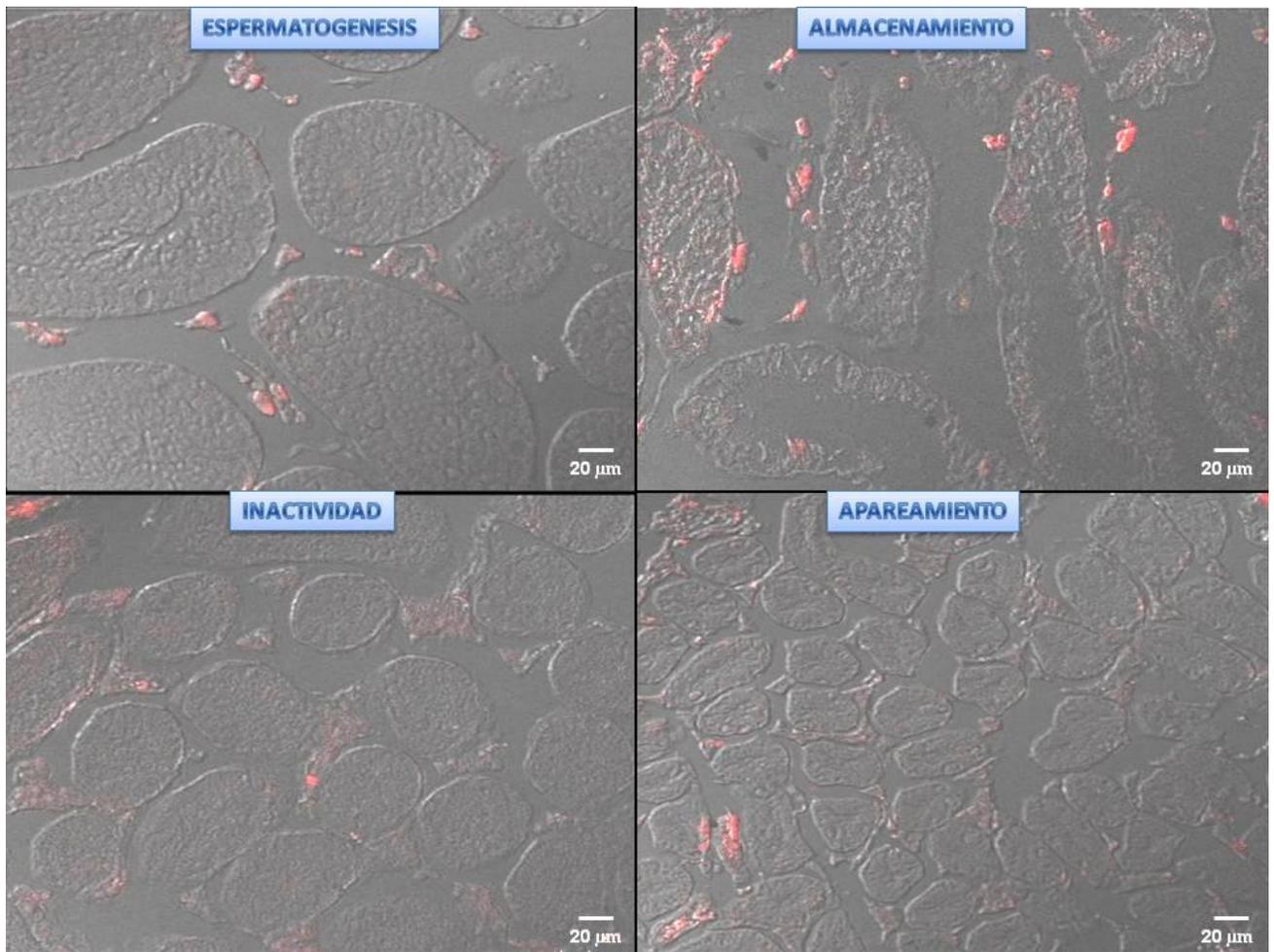


Figura 9. Fotomicrografías de secciones histológicas de testículo de *C. mexicanus*, representativas de las diferentes etapas del ciclo reproductivo. Se observan en rojo a las células de Leydig inmunoreactivas a testosterona (aumento original X200).

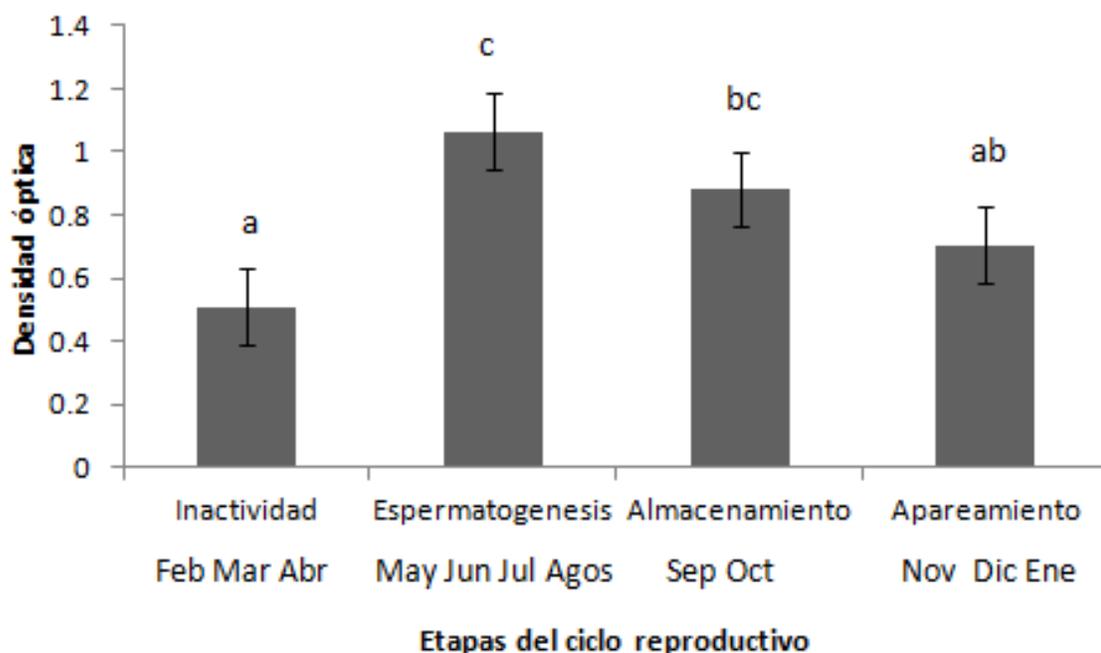


Figura 10. Densidad óptica promedio del inmunomarcaje de testosterona en las etapas del ciclo reproductivo del murciélago macho *C. mexicanus*. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores correspondientes entre las diferentes etapas del estudio (ANOVA, $p < 0.05$).

6.4. Análisis de correlación de los factores externos (temperatura y fotoperiodo) con el número y actividad de las células de Leydig.

Al analizar los datos de pares de variables mediante el análisis de correlación, se observó que hay una relación positiva (correlación de Spearman, con $p < 0.05$) entre los cambios en el número de células de Leydig con respecto a la temperatura ambiental y el fotoperiodo ($r=1$, $p=0.0$) (fig. 11). En cuanto a las condiciones conductuales de los murciélagos (torpor, dormido solitario y en grupo), existe relación de la temperatura ambiente con el fotoperiodo pero no con las temperaturas superficiales (corporal, testicular y epididimaria); solo hay relación de la temperatura ambiente con las temperaturas superficiales corporal y escrotal ($r=0.6$, $p=0.02$).

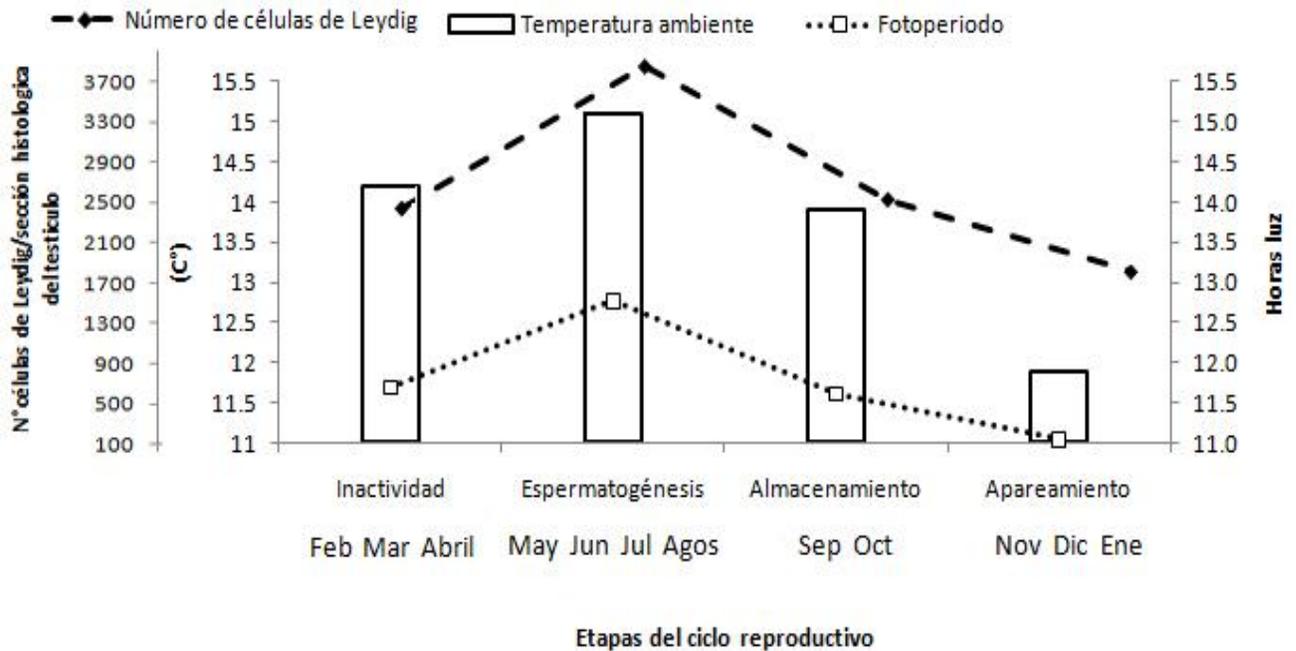


Figura 11. Correlación entre los valores correspondientes a la temperatura ambiente de la zona donde se encuentra el refugio de los murciélagos, el fotoperiodo y número de células de Leydig para las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *C. mexicanus*

Existe una disminución gradual en el número de células de Leydig de la etapa de espermatogénesis a la etapa de apareamiento, posteriormente hay un aumento en la etapa de inactividad, se podría pensar que la población de células de Leydig se conservan. Mientras que en la densidad óptica, es un indicador de concentración de testosterona, esta variable disminuye proporcionalmente y de manera lineal, lo que quiere decir que en la etapa de inactividad no hay tanta producción; hay relación de estas dos variables en las etapas de espermatogénesis, almacenamiento y el apareamiento, existe correlación en la etapa de inactividad reproductiva ($r=0.8$, $p=0.01$) (fig.12).

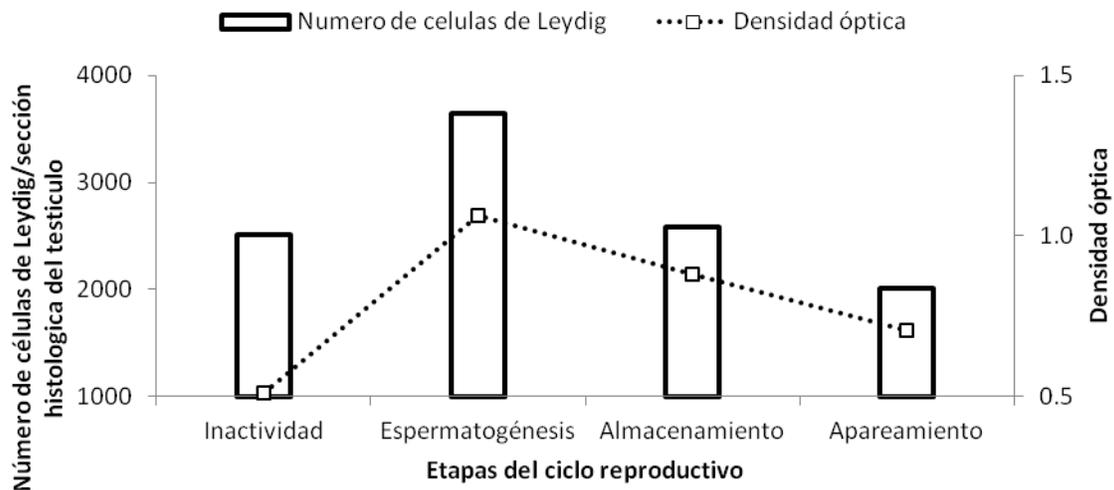


Figura12. Comparación entre la variación promedio en el número de células de Leydig y densidad óptica (como medida de la intensidad de la marca por inmunofluorescencia de la testosterona), con respecto a las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *C. mexicanus*

7. Discusión

En los murciélagos con patrón reproductor estacional, particularmente las especies insectívoras, su alimentación y por ende su disponibilidad energética depende de la variación que se presenta en las poblaciones de insectos. El tamaño de las poblaciones de insectos es influido por la temperatura, precipitación y fotoperíodo, denominados en conjunto factores externos. Por lo tanto procesos como la espermatogénesis, que representan un gasto energético importante para los organismos, incluyendo a los murciélagos y sobre todo para aquellas especies donde hay un aumento considerable en la masa testicular asociado a la actividad de espermatogénesis, como es el caso de *Corynorhinus mexicanus* (León-Galván, *et al.*, 2005), dependen además de la propia regulación endocrina interna, indirectamente

de las variaciones en los factores externos ya mencionados (Racey, *et al.*, 2000). El fotoperiodo como factor abiótico, es reconocido por los organismos cuando las variaciones en la cantidad e intensidad de la luz incide en receptores sensoriales y que a través de una vía neuroendocrina regula procesos involucrados en la reproducción (Heideman, 2000). Beasley y Zucker (1984), determinaron que tanto en condiciones naturales como experimentales, el peso de los testículos de los murciélagos *Antrozous pallidus*, varían dependiendo de los cambios en el fotoperiodo: en invierno, cuando este presenta menor número de horas luz, disminuye el peso de los testículos, en relación al que presentan en el verano, estación en la que el fotoperiodo presenta mayor número de horas luz. En cuanto a *Corynorhinus mexicanus*, encontramos que en la etapa de apareamiento, que se presenta en el invierno, el número de horas luz disminuye, asimismo el volumen testicular y el inmunomarcaje de testosterona intratesticular; en cambio, cuando se presentó el mayor número de horas luz (primavera-verano), se encontraban en la etapa de espermatogénesis, con un aumento en el volumen testicular y en el inmunomarcaje de testosterona en las células de Leydig; estos resultados podríamos explicarlos por los cambios en la síntesis de melatonina que se ve influenciada por la variación en el número de horas luz, y por su participación en la regulación de la actividad reproductiva. El mecanismo de síntesis de la melatonina inicia cuando un estímulo lumínico activa a los fotorreceptores de la retina, se transmite al núcleo supraquiasmático, a través del nervio óptico, para llegar al núcleo paraventricular; la información fótica es retransmitida por las células intermedio laterales de la médula

espinal superior y luego al ganglio cervical superior, y finalmente a la inervación postganglionar de la glándula pineal en donde se sintetiza la melatonina. En oscuridad se presentan niveles altos de melatonina, aumenta la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa de estradiol, lo que modifica la producción de pulsos de GnRH, alterándose la frecuencia de secreción de LH y por consiguiente, la reducción en la biosíntesis de testosterona; al contrario en el día, con la reducción en los niveles de melatonina, no se disminuye la secreción de LH, y se lleva a cabo la biosíntesis de testosterona para mantener la espermatogénesis (Malpaux, 2006; Ebling, 2010). En algunas especies emparentadas con la especie de estudio tales como *C. townsendii*, *Pipistrellus pipistrellus* y *Scotophilus heathi* (Krishna y Singh, 1997) el volumen testicular presenta, también, cambios correspondientes a las etapas de espermatogénesis (aumento) y apareamiento (reducción) en periodos anuales similares a los de *C. Mexicanus*, por lo que mecanismos como el ya descrito, sobre la actividad de la melatonina en especies estacionales, puede estar involucrado. Un trabajo presentado por Jolly y Blachswon, en donde determinaron que el volumen testicular, el volumen de las glándulas accesorias, el número de espermatocitos, espermatozoides y células de Leydig, aumentan en verano cuando la temperatura ambiente se eleva, en tanto que en invierno estos parámetros disminuyen y consecuentemente la espermatogénesis se ve disminuida. En nuestros resultados, también, por cambios en la temperatura ambiente, cuando esta aumenta, se incrementa el volumen testicular, la densidad de las células de Leydig y se presenta la espermatogénesis, en tanto que, cuando estos

parámetros disminuyen los ejemplares de *C. mexicanus* se encuentran en apareamiento e inactividad reproductiva, en condiciones de baja temperatura. Ahora bien, estos cambios en la temperatura ambiente pueden activar al receptor transitorio vaniloide potencial 1 (TRPV1), que se encuentra en las fibras sensoriales de nervios espinales y craneales y en varias poblaciones de neuronas en el sistema nervioso central, en vertebrados; estos receptores promueven la despolarización celular así como un incremento de calcio, fenómenos celulares, que se consideran reguladores de la temperatura corporal (Steiner, *et al.*, 2007). De manera que al aumentar la temperatura, se desencadena la liberación de GnRH que trae consigo la secreción de la LH (Glasser, *et al.*, 2004) y a nivel testicular se desencadenan dos vías de señalización: una basada en la activación de la síntesis de testosterona y otra basada en la proteína activadora mitogénica quinasa (MAPK), que regula la actividad proliferativa de las espermatogonias y por tanto facilitadora de la espermatogénesis. Cuando la temperatura corporal disminuye se inhibe la secreción de la LH y no se activa a la MAPK (Chieffi y Minucci, 2004), mientras que se estimulan macrófagos, que pueden estar involucrados en fagocitosis de células de Leydig (Miller, *et al.*, 1983; Molenaar, *et al.*, 1986), con lo cual disminuye la fuente de testosterona testicular.

Los datos sobre las variaciones de la temperatura ambiental y el fotoperíodo de la zona donde se localiza el refugio utilizado por los murciélagos *C. mexicanus* que fueron objeto del presente estudio, así como los datos de la temperatura corporal y de los órganos sexuales (testículo y epidídimo), aún cuando su registro fue a nivel

superficial, nos muestran que hay una estrecha relación entre el aumento en la temperatura ambiental y el fotoperiodo con la actividad del proceso de espermatogénesis, en el periodo de primavera-verano. Mientras que la regresión en el proceso de la espermatogénesis y su inactividad se llevan a cabo en la temporada del año con menor temperatura ambiental y con un fotoperiodo con menor número de horas luz. Cabe mencionar que para ésta temporada, el efecto de la disminución en las variables abióticas indicadas, no afecta de igual manera a otros órganos sexuales diferentes al testículo, pues los murciélagos llevan a cabo los apareamientos en el otoño. La etapa de apareamiento está sustentada en la cantidad de espermatozoides que se encuentran almacenados en el epidídimo a partir de septiembre (Rodríguez *et al.*, 2010), y a la actividad de las glándulas sexuales accesorias cuyos productos de secreción conforman junto con los espermatozoides epididimarios el semen, que será depositado en el tracto genital femenino durante la cópula. En esta etapa del ciclo reproductor se observa menor actividad espermatogénica y su temperatura corporal no excede de 12°C, con lo cual disminuye la producción de LH, por tanto no hay activación de la MAPK y no se presenta la espermatogénesis, y se estimula la actividad fagocítica de macrófagos sobre células de Leydig y por ende reducción de producción de testosterona intratesticular, como lo sugiere el modelo propuesto por Chieffi y Minucci, 2004.

Los murciélagos son heterotermos temporales, su temperatura corporal experimenta oscilaciones cíclicas, tienen una temperatura mayor durante el periodo de actividad y menor durante periodos de reposo; normalmente la temperatura corporal se

mantiene por encima de la temperatura ambiental. La temperatura corporal es superior de 1-3°C con respecto a la temperatura de los testículos, que requieren esa temperatura menor para producción espermática, durante la espermatogénesis. El escroto ayuda a regular la temperatura de los testículos y cambia de tamaño, para mantener la temperatura adecuada para la actividad espermatogénica (Fowler y Racey, 1987). Al elevarse la temperatura testicular se afecta la espermatogénesis, la movilidad del espermatozoide y la biosíntesis de los andrógenos testiculares (Thwaites *et al*, 1982; Wetteman *et al*, 1976; Cameron y Blackshaw, 1980). En el presente trabajo se observa la estrecha relación entre la variación de la temperatura ambiental, corporal y escrotal (testículo y epidídimo), patrón similar al descrito por Fowler y Racey (1987). Así mismo nuestros resultados de inmunomarcaje de testosterona son consistentes con la influencia referida de los cambios de la temperatura ambiente sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en el que la secreción de LH y por consiguiente en la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig (Glasser, *et al.*, 2004).

En nuestro trabajo se observa que la espermatogénesis no se presenta en organismos que se encuentran en torpor y dormidos solitarios, en tanto que en los dormidos en grupo no se encontraron nunca en inactividad reproductiva. Estos resultados corroboran lo reportado por López-Wilchis, (1989) y León-Galván *et al.*, (1999) ya que el aletargamiento conductual o torpor es de octubre a febrero y es cuando se presentan las etapas de almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo, apareamiento e inactividad reproductiva. El torpor es utilizado como una

estrategia energética y de ahorro de agua especialmente durante los periodos de baja temperatura ambiente, baja disponibilidad de alimentos, o ambos. En los murciélagos disminuye su temperatura corporal y su metabolismo, como consecuencia de menor gasto energético, reducen, además, sus actividades de forrajeo, se les dificulta la digestión, se suprime la función inmune, aumenta la vulnerabilidad a la depredación, da lugar a la acumulación de sueño, reduce la eficiencia sináptica e impacta a la espermatogénesis, al disminuirla (Dietz y Kalko, 2006). El murciélago *Antrozous pallidus* presenta una estrategia de termorregulación durante el invierno, que es el torpor diario, en donde se reduce al mínimo cualquier gasto de energía y pérdida de agua por evaporación, decayendo el apareamiento y con la disminución potencial del éxito reproductivo (Rambaldini y Brigham, 2008). Es probable que *C. mexicanus* presente una estrategia similar, sin embargo, es importante afinar la técnica para determinar las temperaturas testicular y epididimaria, ya que durante las etapas de apareamiento e inactividad reproductiva no es posible discernir entre las dos, por su imperceptible diferencia de tamaño, y el hacerlo puede aportar información respecto a la relación de estas temperaturas. En este sentido es importante destacar que la diferencia entre estas temperaturas en las condiciones conductuales de torpor, dormidos solitarios y en grupo, durante las etapas de almacenamiento y apareamiento con la temperatura corporal muestran, en apariencia, una relación poco usual, ya que la testicular es prácticamente igual a la corporal e incluso superior. Sin embargo, la epididimaria en las diferentes condiciones en las etapas referidas se mantiene entre 14 y 19° C por debajo de la

ambiental, corporal y testicular, situación importante para mantener la viabilidad de los espermatozoides ahí almacenados, y no en el testículo. Prospectivamente resultaría importante conocer si la condición conductual favorece la capacidad reproductiva, relación que por el momento no se realizó en el presente trabajo.

El cambio en la densidad de células de Leydig adultas por unidad de área y de longitud depende de la condición reproductiva en la que se encuentre el individuo (Davidoff, et al., 2004), si disminuyen los niveles de testosterona, también se reduce la funcionalidad de las células (Vermeulen y Kaufman, 1995). De acuerdo a nuestros resultados se presentan cambios en la densidad por unidad de área de las células de Leydig, en la longitud, así como en el inmunomarcaje de testosterona en la etapa de espermatogénesis con respecto a las etapas de inactividad, almacenamiento y apareamiento. Por tanto si consideramos que se reporta que la apoptosis ocurre focalmente dentro de los túbulos seminíferos y no en las células de Leydig (Brinkworth, et al., 1997), en el espacio intersticial los macrófagos fagocitan a las células de Leydig, cuando se presenta una baja en la síntesis de testosterona (Miller, et al., 1983; Molenaar, et al., 1986); nuestros resultados sugieren que el número de células varía, ya que disminuye su número cuando se detiene la espermatogénesis (etapa de inactividad). En nuestros resultados en la etapa de espermatogénesis, es cuando se presenta el mayor número de células de Leydig adultas, entonces existe una proliferación de las mismas (Russell, et al., 1995), por el incremento de la LH (Keeney y Ewing, 1990), que promueve la síntesis de testosterona, para llevar a cabo la espermatogénesis. Entonces la producción de testosterona intratesticular que se

determinó por la inmunotinción y en número de células de Leydig sustenta a la espermatogénesis, en tanto que las funciones complementarias como el almacenamiento epididimario de espermatozoides, los apareamientos (hay producción de sustancias de secreción por parte de las glándulas sexuales accesorias y la expresión de la libido), requiere de menores cantidades de testosterona de origen testicular o bien de otra fuente de andrógenos. Gustafson y Damassa, mostraron que el murciélago *Myotis lucifugus*, presenta un patrón reproductivo masculino asincrónico y se ha documentado que el nivel de testosterona en plasma sanguíneo de los murciélagos sigue un patrón en donde el valor más alto se presentó durante el verano (espermatogénesis) y la concentración más baja se registró durante el periodo de apareamiento, el cual se encuentra superpuesto al período de torpor. Aún cuando la cuantificación de testosterona documentada en el trabajo mencionado para el murciélago *M. lucifugus*, anteriormente, se realizó en plasma, lo cual no indica cual es la fuente precisa de testosterona, pero que presenta similitud con lo encontrado en el presente trabajo de investigación, donde la fuente de testosterona detectada es particularmente el testículo por inmunotinción.

Los resultados descritos en éste trabajo y en el de Gustafson y Damassa (1984), destacan la importancia de revisar otras fuentes de andrógenos que den el control de las funciones sexuales secundarias en los murciélagos con patrón reproductivo asincrónico, como podría ser la glándula suprarrenal que es productora de testosterona (Goel y Bale, 2010). Los corticosteroides de la glándula suprarrenal, por lo general, ejercen efectos inhibitorios sobre la actividad esteroideogénica de las

células de Leydig (Hedger y Hales, 2006); y el mecanismo de la glándula suprarrenal comienza con la liberación de dos neuropéptidos, la hormona liberadora de corticotoprina (CRH) y de la vasopresina desde las neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico, se transportan a la hipófisis anterior y ahí estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) durante el estrés, se transporta por sangre a la corteza adrenal de la glándula suprarrenal, donde estimula la biosíntesis de mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos (testosterona, dihidrotestosterona, androstendiona y dehidroepiandrosterona) (Ferín,2006). La testosterona que se produce en la corteza adrenal es menor a la producida en el testículo, pasa por sangre hasta llegar a la uretra y así pasa a las glándulas accesorias secundarias, en donde estimulan, en particular, al tejido muscular y conectivo, también presenta vascularización del epitelio glandular (Thompson, 2011); por lo mencionado anteriormente es importante analizar a la glándula suprarrenal, que podría ser la que sustenta la etapa de apareamiento de *Corynorhinus mexicanus*.

8. Conclusiones

- Las variaciones en las temperaturas ambiental del refugio y la superficial: corporal y escrotal (testicular y epididimaria), se relacionan en función de las diferentes condiciones reproductivas y conductuales (torpor, dormido solitario y en grupo) de los ejemplares de *C. mexicanus* a lo largo del ciclo reproductivo anual.

- La temperatura ambiente externa se relaciona directamente con el fotoperiodo de la Sierra de Tlaxco, Tlaxcala.
- El volumen testicular cambia a lo largo del ciclo reproductivo del murciélago *C. mexicanus*.
- El cambio en el número de células de Leydig y su producción de testosterona en el testículo, se relaciona con el patrón reproductivo de la especie de estudio.
- Existe relación directa entre la temperatura ambiente externa e interna y el fotoperiodo de la Sierra de Tlaxco, Tlaxcala, el número y la producción de testosterona en las células de Leydig con el patrón reproductivo de *Corynorhinus mexicanus*.
- Existe la necesidad de determinar la actividad celular y hormonal de las glándulas suprarrenales en la etapa de apareamiento, a fin de comprender mejor los mecanismos involucrados en la estrategia reproductiva que presenta este tipo de mamífero.

9. Referencias

- Andersson A. M., Carlsen E., Petersen J. H., y Skakkebaek N. E. 2003. Variation in levels of serum inhibin B, testosterone, estradiol, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and sex hormone-binding globulin in monthly samples from healthy men during a 17-month period: possible effects

of seasons. The journal of clinical endocrinology and metabolism 88(2): pp. 932-937.

- Anthony E. L. P. 1988. Age determination in bats. En: Ecological and behavioral methods for the study of bats. H. T. Kunz, editor. Smithsonian Institution Press, Washington D. C. pp. 47-58.
- Anthony E. L. P. 2000. Endocrinology of reproduction in bats: central control. *En: Reproductive biology of bats.* E. G, Crichton and P. H. Krutzsch, editores. Academic Press, London, United Kingdom. pp. 1-26.
- Beasley J. L., y Zucker I. 1984. Photoperiod influences the annual reproductive cycle of the male pallid bat (*Antrozous pallidus*), California, 70, pp. 567-573.
- Bernard R. T. F. 1986. Seasonal changes in plasma testosterone concentrations and Leydig cell and accessory gland activity in the Cape horseshoe bat (*Rhinolophus capensis*). *Journal Reproduction and Fertility.* 78, pp. 413-422.
- Bicego C. K., Barros H. C., y Branco G.S. 2007. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147: pp. 616–639.
- Bronson F. H. 1989. *Mammalian reproductive biology.* USA. pp.325

- Bronson F. H., y Heideman P. D. 1994. Season regulation of reproduction in mammals. En: The physiology of reproduction. E. Knobil y J. D. Neil editores. Raven Press, New York. pp. 541-583.
- Brinkworth, M., Weinbauer, G., Bergmann M., y Nileschlag E. 1997. Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *International Journal of Andrology*. 20: pp. 222-8.
- Bumrungsri, S. Harrison. D. L., Satasook C., Prajukjitr A., Thong-Agree S., y Bates P. J. J. 2006. A review of bats research in Thailand with eight new species records for the country. *Acta Chiropterologica*, 8: pp. 325-359.
- Burles D. W., Brigham R. M., Ring R. A., y Reimchen T. E. 2009. Influence of weather on two insectivorous bats in a temperate Pacific Northwest rainforest. *Journal of Zoology*. 87: pp. 132-138.
- Cameron R.D., y Blackshaw A.W. 1980. The effect of elevated ambient temperature on spermatogenesis in the boar. *Journal of Reproduction and Fertility*. 59: pp. 173-179.
- Ceballos G., y Olivia C. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Fondo de Cultura Económica editorial. México, D.F. pp. 986.
- Cervantes M. I, Arenas-Ríos E., León-Galván M. A., López-Wilchis R., Ambriz D., y Rosado A. 2008. Spermatozoa epididimal maturation in the mexican big-

eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54: pp. 196-204.

- Chieffi P., y Minucci S. 2004. Environmental influence on testicular MAP kinase (ERK1) activity in the frog *Rana esculenta*. *The Journal of Experimental Biology* 207: pp. 2209-2213
- Cunningham M.J., Clifton D.K., y Steiner R.A. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology and Reproduction*. 60: pp. 216–222.
- Davidoff M. S., Middendorff R., Enikolopov G., Riethmacher D., Holstein A. F., y Müller D. 2004. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *The Journal of Cell Biology*. 167; pp. 935-944.
- Delgado M. J., Gutiérrez P., y Alonso-Bedate M. 1989. Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezii*. *General and Comparative Endocrinology*. 73(1): pp. 1-11.
- Dietz M., y Kalko E. K. V. 2006. Seasonal changes in daily torpor patterns of free-ranging female. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental physiology*. 176: pp. 223–231.
- Ebling F. J., 2010. Photoperiodic regulation of puberty in seasonal species. *Molecular Cellular and Endocrinology*. 324(1-2): pp. 95-101.

- Entwistle C. A., Racey P. A. y Speakman J. R., 1998. The reproductive cycle and determination of sexual maturity in male brown long-eared bats, *Plecotus aritus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Zoology, London*, 244: pp. 63-70.
- Ferin M. 2006. Stress and the reproductive system. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Tercera edición. Jimmy D. N. editor, 25: pp. 2627-2696.
- Florman y Ducibella. 2006. Fertilization in mammals, En: *Physiology of Reproduction*. Neill J.D., editor. Elsevier, San Diego, CA, pp. 55–112.
- Folch J., 1984. The influence of age, photoperiodism and temperature on semen production of rams. En: *The male in farm animal reproduction*. Courot M. Boston, pp. 141-160.
- Fowler P. A., y Racey P.A. 1987. Relationship between body and testis temperatures in the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, during hibernation and sexual reactivation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 81: pp. 567-573.
- Glasser F., Mikolajczyk T., Jalabert B., Baroiller J. F., y Breton B. 2004. Temperature effects along the reproductive axis during spawning induction of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *General and Comparative Endocrinology*. 136: pp.171–179.

- Goodman R. L. 1999. Seasonal Reproduction, mammals. En: Encyclopedia of reproduction. Knobil y Neill's Editores. Academic Press. pp. 341-350
- Goel N., y Bale T. L. 2010. Sex differences in the serotonergic influence on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal stress axis. *Endocrinology*. 151(4): pp. 1784-1794.
- Gustafson A. W. 1979. Male reproductive patterns in hibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 56: pp. 317-331.
- Gustafson A. W., y Damassa D. A. 1985. Annual Variations in Plasma Sex Steroid-binding Protein and Testosterone Concentrations in the Adult Male Little Brown Bat: Relation to the Asynchronous Recrudescence of the Testis and Accessory Reproductive Organs. *Biology of reproduction* 33: pp. 1126-1137.
- Hedger M. P. y Hales D. B. 2006. Immunophysiology of the male reproductive tract. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Tercera edición. Jimmy D. N. editor, 25: pp. 1195-1286.
- Heidenman P.D. 2000. Environmental regulation of reproduction. En: *Reproductive biology of bats*. E. G. Crichton y P. H. Krutzsch editores. Academic Press, London. pp. 469-499.

- Jolly S. E., y Blackshaw A. W. 1987. Prolonged epididymal sperm storage, and the temporal dissociation of testicular and accessory gland activity in the common sheath-tail bat. *Journal of Reproduction and Fertility*. 81: pp. 205-211.
- Kawamoto K. 2003. Endocrine Control of the Reproductive Activity in Hibernating Bats. *Zoological science*. 20: pp. 1057–1069.
- Keeney D. S. y Ewing L. L. 1990. Effects of hypophysectomy and alteration in spermatogenic function on Leydig cell volume, number and proliferation in adult rats. *Journal of andrology*. 11 (4): pp. 367-378.
- Kerr J. B., y Sharpe R. M., 1985. Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on rat Leydig cells. A morphometric and ultrastructural study. *Cell and Tissue Research*. 239: pp. 405–415.
- Krishna A., y Sing K. 1997. The relationship between testicular activity, accessory sex glands, and circulating steroid concentration during the reproductive cycle in a male Indian vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Canadian Journal of Zoology* 75: pp. 1042-1050.
- Krutzsch H. P., Crichton G., y Elizabeth 1990. *Reproductive Biology of Bats*. Academic Press. London. pp. 76-155.
- Krutzsch H. P. 2000. Anatomy, Physiology and Cyclicity of the Male Reproductive Tract. En: *Reproductive Biology of Bats*. Crichton G. Elizabeth y Krutzsch H. P., editors. Academic Press. London. pp. 91-155.

- Leblond C. P., y Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 548–573.
- León Galván M. A. 2008. Participación de la muerte celular por apoptosis durante la espermatogénesis en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). Tesis Doctoral UAMI, pp. 95.
- León Galván M. A., López Wilchis R., Hernández Pérez O., Arenas Ríos E., y Adolfo R. 2005. Male Reproductive Cycle of mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *The southwestern naturalist* 50(4): pp. 453–460.
- León-Galván, M. A., Fonseca T., López-Wilchis R., y Rosado A. 1999. Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Canadian Journal of Zoology*, 77: pp. 7-12.
- Lidicker W. Z. 1973. Regulation of numbers in an island population of the California vole, a problem in community dynamics. *Ecological monographs*, 43 (3): pp. 271-302.
- López-Wilchis R. 1989. Fisiología de *Plecotus mexicanus* (Chiroptera vespertilidae) en el estado de Tlaxcala. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp.258.

- Malpoux B. 2006. Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. *En: Physiology of Reproduction*. Knobil and Neill's editores. Academic Press. London. pp. 2231-2282.
- Medellín R.A., Arita H.T., y Sánchez H.O. 2008 Identificación de los Murciélagos de México. Segunda edición. Instituto de ecología UNAM. pp.79.
- Miller E. C., Swanson A. B., Phillips D. H., Fletcher T. L., Liem A., y Miller J. A. 1983. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Research*. 43(3). pp. 1124-1134.
- Molenaar, R., de Rooij, D. G., Rommerts, F.G. G., y van der Molen, H.J. 1986. Repopulation of Leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent Leydig cells with ethylene dimethane sulfonate is dependent on luteinizing hormone and not folliclestimulating hormone. *Endocrinology* 118. pp. 2546-2554.
- Morgentaler A., Stahl B. C., y Yin Y. 1999. Testis and Temperature: An Historical, Clinical, and Research Perspective. *Journal of Andrology*.20 (2): pp. 189-195.
- Pawlowski S., Sauer A., Shears J. A., Tyler C. R., y Braunbeck T. 2004. Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in

the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*. 68(3): pp. 277-91.

- Piaggio A. J. y Perkins S. L. 2005. Molecular phylogeny of North American long-eared bats (Vespertilionidae: Corynorhinus); inter and intraspecific relationships inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and evolution*. 37(3): pp. 762-75.
- Racey P. A. 1982. Ecology of bats reproduction. *En: Ecology of bats*. Kunz T. H., editor. Plenum Press, New York. pp. 57-104.
- Racey P. A. y C. A. Entwistle. 2000. Life-history and reproductive strategies of bats. *En: Reproductive biology of bats*. Crichton E. G., y Krutzsch P. H., editores. Academic Press, London, United Kingdom. pp. 363-414.
- Rambaldini D. A., y Brigham R. M. 2008. Torpor use by free-ranging pallid bats (*Antrozous pallidus*) at the northern extent of their range. *Journal of Mammalogy*, 89(4): pp. 933–941.
- Rodríguez T. A., Arenas-Ríos E., León-Galván M. A. 2010. El almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, adaptación que permite sincronizar. *Contactos* 78, pp. 58–64.
- Roy V. K., y Krishna A. 2010 Evidence of androgen-dependent sperm storage in female reproductive tract of *Scotophilus heathi*. *General and Comparative Endocrinology*. 165(1): pp. 120-6.

- Rusell L. D., de Franca L. R., Hess R., Cooke P. 1995. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue Cell*. 27: pp. 105-128.
- Shanbhag B. A., Radder R. S., Saidapur S. K. 2000. GnRH but not warm temperature induces recrudescence of quiescent testes in the tropical lizard *Calotes versicolor* (Daud.) during postbreeding phase. *General and Comparative Endocrinology*. 119(2): pp. 232-238.
- Simmons N. B. 2005. Order Chiroptera. En: *Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference*. Tercera edición. Wilson D. E. y Reeder D. M. editores. USA. 1: pp.312-529.
- Sokal R. R., y Rohlf F. J. 1995. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, N. Y.
- Speakman R. J., y Rohlf P. A. 1986. The influence of body condition on sexual development of male brown long-eared bats (*Plecotus auritus*) in the wild. *Journal of Zoology, London*. 210: pp. 515-525.
- Stata Corporation. 2001. *Stata statistical software: Release 7.0*. College Station, Texas: Stata Corporation.
- Steiner A. A., Turek F. V., Almeida C. M., Burmeister J. J., Oliveira L. D., Roberts L. J., Bannon W. A., Norman H. M., Louis J., Treanor J. S., Gavva R. N., y Romanovsky A. A. 2007. Nonthermal activation of transient receptor

potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *The Journal of Neuroscience*, 27(28). pp. 7459 –7468.

- Taylor J. F., Porter M. J., Bromage N. R., Migaud H. 2008. Relationships between environmental changes, maturity, growth rate and plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*. 155 (2): pp. 257-270.
- Tena-Sempere M., y Barreiro M. L. 2002. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Molecular and Cellular Endocrinology*. 188: pp. 9.
- Thompson Jr. D. L., Pickett E. L., Squires y Nett T. M. 2011. Sexual behavior, seminal pH and accessory sex gland weights in geldings administered testosterone and (or) estradiol-17 β ¹. *Journal of animal science*. 51: pp. 1458-1366.
- Thwaites C. J., Stapleton D. L., Hinch G. N., y Edey T. N. 1982. Testicular temperature and sperm production in induced cryptorchid lambs. *Australian Veterinary Journal*. 58: pp. 123.
- Tieleman B. I, Williams J. B., Bloomer P. 2003. Adaptation of metabolism and evaporative water loss along an aridity gradient. *Proceedings. Biological Sciences/ the Royal Society B*. **270**: pp. 207–214
- Tumlinson R. 1992. *Plecotus mexicanus*. *Mammalian Species*. 401: pp. 1-3.

- Vermeulen A., y Kaufman J. 1995. Ageing of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men. *Hormone Research*. 43: pp. 25-8.
- Wettemann R. P. y Desjardins C. 1979. Testicular function in boars exposed to elevated ambient temperature. *Biology of Reproduction*. 20: pp. 235-241.

10. ANEXO A

Técnica de Hematoxilina- Eosina

1. Desparafinado: Xileno I (5 minutos), xileno II (5 minutos) y xileno-etanol (1:1) (5 minutos)

2. Hidratación: Etanol anhidro I (5 minutos), etanol anhidro II (5 minutos), etanol 96° GL I (3 minutos), etanol 96° GL II (3 minutos), etanol 80 ° GL (3 minutos), etanol 60 ° GL (3 minutos) y agua destilada (3 minutos).

3. Tinción: Hematoxilina de Harris 5-8 minutos

4. Lavado: Agua corriente 20 segundos

5. Diferenciación: Etanol ácido 20 segundos

6. Agua de la llave 2 segundos

7. Azuleamiento: Substituto de Scott 1 minuto

8. Agua de la llave 20 segundos

9. Contrastado: Eosina Amarillenta 3-4 minutos

10. Agua destilada 40 segundos

11. Deshidratación: Etanol 96° GL I (30 segundos), etanol 96° GL II (30 segundos), etanol anhidro I (30 segundos), etanol anhidro II (30 segundos),

etanol anhidro-xileno (1:1) (30 segundos), xileno I (20 segundos), xileno II (20 segundos).

12. Montaje en Entellan (Merck).

Preparación de colorantes y soluciones

Solución madre de Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina en polvo 1 g

Óxido rojo de mercurio 0.5 g

Sulfato de aluminio y potasio 100 g

Etanol absoluto 10 ml

Agua destilada 200 ml

Disolver la hematoxilina en el etanol absoluto, calentar a baño maría, conservando el vaso tapado; en el vaso de precipitados de 600 ml disolver el sulfato de aluminio y potasio en 100 ml de agua destilada, calentando ligeramente. Se mezclan las dos soluciones y se añaden los 100 ml del agua destilada restante. Se hierve la mezcla un momento, se retira del calor y se deja enfriar. Añadir el rojo de mercurio lentamente (es explosivo) y calentar nuevamente hasta que tome un color rojo púrpura (3 minutos aproximadamente). Enseguida, enfriar con hielo y filtrar 10 veces para eliminar residuos del sulfato.

Solución de Trabajo de Hematoxilina de Harris.

Solución madre de Hematoxilina de Harris 10 ml

Ácido Acético 1 a 3 ml

Se filtra y se usa.

Solución madre de Eosina Amarillenta.

Eosina hidrosoluble 1 g-Agua destilada 20 ml-Etanol de 96° G.L. 80 ml

Se disuelve la eosina en el agua y se le añade el alcohol. Se deja madurar durante tres semanas a la luz y en un frasco transparente.

Solución de trabajo de Eosina Amarillenta.

Una parte de solución madre de eosina amarillenta. Tres partes de alcohol etílico de 80° G.L. Agregar 0.6 ml de ácido acético por cada 100 ml de solución de trabajo.

11. ANEXO B

INMUNOHISTOQUIMICA

1. Desparafinar en la estufa 60° por 30 minutos.
2. Xileno 5 minutos a Temperatura Ambiente (T.A.)
3. Xileno 5 minutos a T.A.

4. Alcohol 100% por 3 minutos.
5. Alcohol 95% -3 minutos.
6. Alcohol 90% -3minutos.
7. Alcohol 80% -3minutos.
8. Alcohol 70% -3minutos.
9. Agua destilada- 3 minutos.
10. Colocar el marcador hidrofóbico alrededor de la muestra.
11. Preparar la cámara húmeda y colocar las laminillas.
12. PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) durante 10 minutos cada laminilla.
13. Colocar TRITON 1% (SIGMA) durante 10 minutos.
14. Realizar un lavado rápido a cada laminilla con PBS 1X.
15. Bloquear con albumina al 1% durante 2 horas a Temperatura Ambiente.
16. Incubar con el anticuerpo primario (abcam) a 4 °C toda la noche.
17. Realizar 4 lavados a cada laminilla con PBS durante 5 minutos cada una (el primer lavado es doble).
18. Realizar un lavado a cada laminilla con albumina al 1% durante 5 minutos.

19. Incubar con el anticuerpo secundario (Calbiochem) durante 1 hora.
20. Realizar 4 lavados a cada laminilla con PBS 1X durante 5 min cada uno.
21. Montar cada laminilla con DAKO.

Preparación de Soluciones

TRITON 1%

TRITON 1ml----PBS 99ml

250 μ l-----25ml

Anticuerpo primario testosterona (ab8557), 1:50 μ l

Anti testosterona 1 μ l-----Solución de Albumina 49 μ l

Albumina al 1%: Albumina 1ml-----PBS 99ml

Anticuerpo secundario (401321)

Anti-Conejo 1 μ l-----Solución de Albumina 99 μ l