



**DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA Y EXPRESIÓN DE
LA SEROTONINA EN LA GLÁNDULA MAMARIA
DEL MURCIÉLAGO *MYOTIS VELIFER*: ASPECTOS
RELEVANTES DURANTE LA LACTANCIA.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

BIÓLOGO CRISTIÁN VELA HINOJOSA

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTOR DR. MIGUEL ANGEL LEÓN GALVÁN

CODIRECTOR DR. FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ TREJO

ASESOR M. EN C. GERARDO LÓPEZ ORTEGA

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

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

CRISTIÁN VELA HINOJOSA

El día _____ de _____ del año de _____.

Miembros del Jurado

Asesor: M en C Gerardo López Ortega

Sinodal: Dra. Edith Arenas Ríos

Sinodal: Dr. José Luis Contreras Montiel

Sinodal: Dra. Gisela Fuentes Mascorro

Agradecimientos

A mi familia.

A la Universidad Autónoma Metropolitana.

A mi comité tutorial.

A mis compañeros de la Maestría en Biología por su apoyo.

Al Conacyt por el otorgamiento de la beca con registro de CVU 418503

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) por el otorgamiento de un apoyo para la asistencia al simposio Internacional de Epigenética y Biología del desarrollo 2012 celebrado en Xalapa, Veracruz.

A Ahiezer Rodríguez Tobón, de la UAM-I por su participación en las colectas en 2012, y su valiosa asesoría al realizar la descripción histológica.

A los integrantes del laboratorio F-206 de la facultad de química, UNAM por su valiosa asesoría para la realización del presente trabajo; en particular al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, a la Dra. Adriana Mendoza, Ricardo Vázquez, Alejandra Martínez y Yanira Franco

A la Dra. Patricia Padilla del Instituto de Investigaciones biomédicas, UNAM, por su valiosa contribución en la realización de la cuantificación de 5-HT y L-Trp por HPLC.

A la histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata de la Facultad de Medicina, UNAM, por su contribución en la inmunohistoquímica.

Resumen

De las 138 especies de murciélagos existentes en México, alrededor del 7% pertenecen al género *Myotis*, por lo que éste es considerado como el de mayor representación en el país. *Myotis velifer*, la especie objeto del presente estudio, es un microquiróptero hibernante en el cual es probable que los individuos pertenecientes a poblaciones del centro de México, realicen desplazamientos altitudinales entre los 1000 y los 3000 msnm, asociados a su necesidad de realizar un aletargamiento fisiológico durante el periodo invernal en zonas altas, mientras que la gestación y lactancia la realizan en zonas de menor altitud.

Myotis velifer presenta un patrón reproductivo monoéstrico, enmarcado por una clara asincronía temporal de sus funciones y eventos reproductivos. Las cópulas ocurren durante el otoño tardío y pueden postergarse hasta el invierno durante el periodo de hibernación, en momentos en los que los machos despiertan del aletargamiento. Sin embargo, la ovulación es postergada y el espermatozoides es almacenado en el tracto genital femenino (vagina-útero). De esta manera, la fertilización y la gestación ocurren después de la temporada de hibernación y las crías nacen en la primavera. Esta estrategia asegura que los nacimientos estén programados para brindar mayores probabilidades de supervivencia, tanto a la madre como a la cría. Otro rasgo importante del patrón reproductivo de *M. velifer* consiste en que el ciclo de la glándula mamaria es caracterizado por presentar drásticos cambios morfológicos relacionados con el desarrollo de la glándula durante la lactancia y una marcada involución que determina el destete de las crías.

La glándula mamaria es el rasgo distintivo al cual deben su nombre los mamíferos, un órgano capaz de experimentar grandes cambios dependiendo de su estado fisiológico. Se han identificado tres etapas principales a lo largo del ciclo de desarrollo de la glándula mamaria: lactancia, involución y fase de reposo. Durante la fase de involución, tiene lugar una drástica remodelación histológica iniciada con el rompimiento de las uniones estrechas entre las células epiteliales, en este proceso participa la serotonina (5-HT) una amina neurotransmisora cuyos efectos en el sistema nervioso central han sido muy estudiados. En cuanto a su participación en la glándula mamaria, la Serotonina (5-HT) juega un papel importante en la homeostasis de volumen intraluminal de la glándula durante la lactancia e involución, a través de la activación del receptor 5-HT₇, siendo las enzimas triptofano hidroxilasa (TPH) y monoamina oxidasa A (MAO-A) componentes importantes del sistema serotoninérgico. Los objetivos del presente trabajo fueron: precisar el área geográfica donde se lleva a cabo la lactancia de *M. velifer* en tres diferentes poblaciones distribuidas en un gradiente altitudinal del Centro de México; establecer el periodo de lactancia; describir los cambios morfológicos macroscópicos e histológicos en la glándula mamaria de esta especie durante un ciclo reproductivo anual para reconocer la probable relación entre las características externas de la mama con la estructura interna de la glándula mamaria; determinar la presencia y distribución de los marcadores serotoninérgicos (TPH, MAOA y 5-HT) en la glándula mamaria; y evaluar su expresión de manera comparada entre las condiciones de lactancia, involución y reposo, para aportar información acerca de la participación de la 5-HT en la regulación de la función de este órgano en murciélagos estacionales.

Para cumplir con los objetivos se capturaron cuatro hembras adultas en tres diferentes condiciones fisiológicas de la glándula, correspondientes al periodo de lactancia (mayo), involución (julio) y reposo (agosto). Se realizó una descripción de la morfología gruesa y de la histología, ésta última mediante tinción con hematoxilina-eosina. Se realizó la detección y cuantificación de los marcadores serotoninérgicos mediante inmunohistoquímica, Western blot y HPLC. Los resultados muestran que sólo en una de las tres poblaciones de estudio de *M. velifer* se lleva a cabo la lactancia, y ésta ocurre en la zona de menor altitud (Cueva Chicomostoc, 1420 msnm) a partir de finales de abril hasta todo julio. Así mismo, se observaron cambios drásticos en la morfología e histología de la glándula mamaria a lo largo del ciclo anual. Además, se detectaron variaciones en los niveles de 5-HT, TPH y MAO-A entre los diferentes estados fisiológicos de la glándula, registrándose la mayor concentración durante la lactancia. Se encontró marcaje positivo para 5-HT y TPH en el citoplasma de las células epiteliales y mioepiteliales y en el estroma interlobular, mientras que MAO-A fue localizada en las células epiteliales y en los productos de secreción. Los resultados sugieren una participación de la 5-HT en el proceso de involución de la glándula, a través de un mecanismo similar al reportado para otros mamíferos.

Abstract

Of the 138 species of bats exist in Mexico, most belong to the genus *Myotis*, therefore, it is considered the largest bat genus in the country. *Myotis velifer*, the species chosen for this study, is a hibernating microchiropteran in which although it has not been conclusively determined, it is likely that individuals in populations from central Mexico perform altitudinal shifts between 1000 and 3000 m associated with undergoing hibernation at high altitudes, while pregnancy and lactation performed in lower altitudes.

Myotis velifer exhibits a monoestric reproductive pattern, framed by a clear temporal asynchrony of reproductive functions and events. Mating usually occurs during late fall and can be performed in winter, when males temporally arouse from hibernation. However, ovulation is delayed and the sperm is stored in the female genital tract (uterus-vagina). Thus, fertilization and gestation occur after hibernation season and the young are born in springtime. This strategy ensures that births are scheduled to provide greater chances of survival for both, the mother and the offspring. Another important feature of the reproductive pattern of *M. velifer* is that the mammary gland cycle is characterized by undergoing drastic morphological changes associated with the development of the gland during lactation, and a marked involution determines the weaning of the youngster.

The mammary gland is unique to the Class Mammalia, being an organ capable of undergoing great changes depending on its physiological condition. Three main stages have been identified throughout the cycle of mammary gland development:

lactation, involution and resting phase. During involution, a drastic histological remodeling occurs initiated by the breakdown of tight junctions between epithelial cells. Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter whose effects on the central nervous system have been widely studied. Regarding its participation in the mammary gland cycle, Serotonin (5-HT) plays an important role in intraluminal volume homeostasis of this organ during lactation and involution, through activation of 5-HT₇ receptor, being the enzymes TPH and MAOA important components of serotonergic system.

The objectives of this study were to establish breastfeeding period for *M. velifer* and the area where is carried out in three different populations distributed along an altitudinal gradient in Central Mexico, to describe macroscopic and histological changes in the mammary gland of this species during an annual reproductive cycle in order to recognize the probable relationship between the external features of the breast with the internal structure of the mammary gland., to assess the presence and distribution of serotonergic markers (TPH, MAO-A and 5-HT) in the mammary gland, and to evaluate their expression in a comparative way between lactation and involution conditions to provide information about the involvement of 5-HT in regulating the function of that organ in seasonal bats.

In order to meet the objectives of this study, Four individuals were captured in three different physiological conditions of the gland: lactation (May), involution (July), and resting phase (August). Histological description was carried out by hematoxylin-eosin staining, and detection and quantification of 5-HT, MAO-A and TPH was performed using immunohistochemistry, Western blot and HPLC methods. Results show that population of *M. velifer* in central Mexico perform breastfeeding at lower altitudes

(Cave Chicomostoc, 1420 m) from the end of April to July. Drastic histological and macroscopical changes were observed in mammary gland throughout the annual cycle. Variations in the levels of 5-HT, TPH and MAO-A between different physiological states of the gland were detected, being higher during lactation. Positive immunostaining was found for 5-HT and TPH in the cytoplasm of epithelial and myoepithelial cells as well as in stromal tissue, while MAO-A was found in the epithelial cells and secretory products. Results suggest the involvement of 5-HT in the process of involution of the mammary gland, through a mechanism similar to that reported for other mammals.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Myotis velifer</i>	1
1.2 Reproducción.....	2
1.3 Hibernación.....	4
1.4 Los desplazamientos.....	5
1.5 Lactancia y crías	6
1.6 La glándula mamaria.....	9
1.7 Origen de la glándula mamaria.....	14
1.8 Particularidades de la glándula mamaria en murciélagos.....	16
1.9 Involución de la glándula mamaria.....	18
1.9-A Histología de la glándula mamaria	19
1.9-B La Serotonina.....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVO.....	27
5.1 Objetivos particulares.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODO.....	28
6.1 Trabajo de campo.....	28
6.2 Revisión de datos	36
6.3 Trabajo de laboratorio.....	37
6.4 Descripción macroscópica e histológica básica.....	37

6.5 Inmunohistoquímica	39
6.6 Doble Inmunohistoquímica	41
6.7 Western Blot	42
6.8 HPLC.....	44
6.9 Análisis estadístico.....	45
7. RESULTADOS.....	45
7.1 Revisión de datos.....	45
7.2 Descripción macroscópica	51
7.3 Descripción histológica	54
7.4 Inmunohistoquímica	56
7.5 Doble inmunohistoquímica	56
7.6 Western Blot	59
7.7 HPLC	61
8. DISCUSIÓN.....	62
9. CONCLUSIONES.....	73
10. BIBLIOGRAFÍA.....	75
12. ANEXO I.....	94
13. ANEXO II.....	97
14. ANEXO III.....	98

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de <i>Myotis velifer</i>	2
Figura 2. Desarrollo de la glándula mamaria de ratón a lo largo del ciclo de la glándula mamaria.....	11
Figura 3. Apariencia externa de la glándula mamaria en <i>M. velifer</i>	16
Figura 4. Sistema epitelial de Serotonina mamaria.....	22
Figura 5. Mapa en donde se muestra la ubicación de los tres sitios de estudio...	30
Figura 6. Fotografías de los sitios de estudio.....	31
Figura 7. Distribución actitudinal de los refugios en los que habita <i>M. velifer</i>	32
Figura 8. Captura de individuos mediante trampas tipo arpa.....	34
Figura 9. Fotografías obtenidas en campo de diferentes estados de desarrollo la glándula mamaria.....	36
Figura 10. Gel en la cámara de electroforesis.....	43
Figura 11. Gel teñido con azul de Coomassie.....	43
Figura 12. Condición de la glándula a lo largo del ciclo anual en hembras adultas durante el año 2009.....	47
Figura 13. Condición del pezón a lo largo del ciclo anual en hembras adultas durante el año 2009.....	48
Figura 14. Variaciones en la masa corporal de hembras adultas a lo largo del año 2009.....	50
Figura 15. Apariencia externa de la glándula mamaria en lactancia (A), a inicios de la involución (B), Finales de la involución (C) y durante el reposo (D).....	52
Figura 16. Variaciones morfométricas en el diámetro medio de la glándula mamaria (A) y el pezón (B).....	53

Figura 17. Histología de la glándula mamaria a lo largo del ciclo anual.....	55
Figura 18. Inmunohistoquímica para MAO-A en lactancia, involución y reposo....	57
Figura 19. Inmunohistoquímica para MAO-A y TPH.....	57
Figura 20. Doble inmunohistoquímica para MAO-A, TPH y 5-HT.....	58
Figura 21. Inmunohistoquímica para MAO-A y TPH vs células epiteliales y mioepiteliales.....	59
Figura 22. Blots representativos para TPH y MAO-A y análisis de densitometría..	60
Figura 23. Niveles de 5-HT y L-Trp mediante HPLC.....	61
Figura 24. Propuesta de sistema epitelial de 5-HT en glándula mamaria de murciélago.....	69

Introducción

México es uno de los países con mayor número de especies nativas de mamíferos con alrededor de 525, de las cuales se han registrado 137 especies de murciélagos, y de estos, 15 son endémicos y 38 se encuentran considerados en alguna categoría de riesgo (Eguiarte, 2006; Bradley, 2007; SEMARNAT, 2010).

***Myotis velifer* (J. A. Allen, 1890)**

Myotis velifer, es un microquiróptero perteneciente a la familia Vespertilionidae, del que se reconocen tres subespecies: *M. v. grandis*, que se encuentra restringida a una pequeña área de los Estados Unidos de Norte América; *M. v. incautus*, que tiene un área de distribución más amplia, pero se restringe a las zonas fronterizas entre Estados Unidos y México, y *M. v. velifer*, que es precisamente el objeto de estudio de este trabajo, la cual cuenta con el área de distribución más amplia, abarcando el oeste, centro y sureste de México e incursiona hasta Honduras (Fitch et al., 1981; Krutzsch, 2009; figura 1).

El murciélago *M. velifer* es insectívoro, su masa corporal oscila entre los 7.5 y los 12 g, y se asocia con ambientes templados, áridos y semitropicales (Fitch et al., 1981).

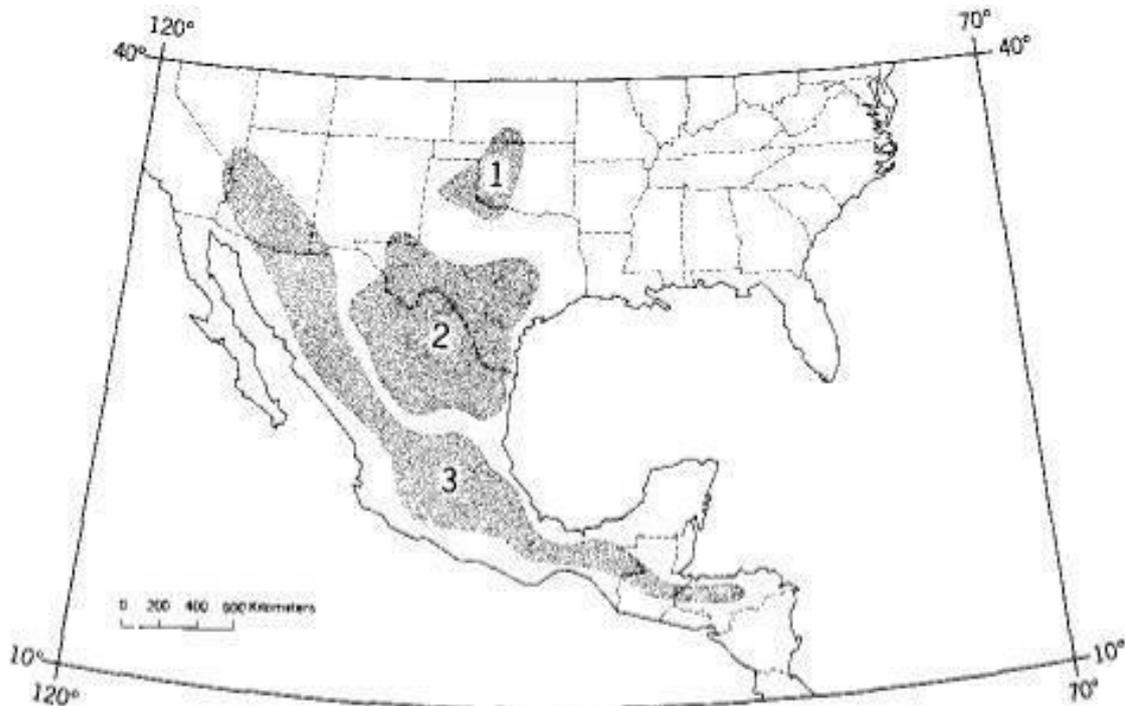


Figura 1. Mapa de distribución de *Myotis velifer*, incluyendo a las subespecies: 1, *M. v. grandis*; 2, *M. v. incautus*; 3, *M. v. velifer*. (Tomado de Fitch et al., 1981)

Reproducción

Los murciélagos como grupo, cuentan con una amplia variedad de modificaciones respecto al patrón reproductivo general de los mamíferos; la mayoría de especies son estacionales y varias, sobre todo aquellas insectívoras que habitan en zonas templadas, han desarrollado diferentes estrategias reproductivas para asegurar que los nacimientos estén programados para brindar mayores probabilidades de supervivencia, tanto a la madre como a la cría en términos de alimentación (Mateos, 1995; Bradley, 2007). Estas estrategias se enfocan en la búsqueda y obtención de un buen suministro de alimento para sustentar por una parte, la gestación y la lactancia, que son los procesos más costosos en términos energéticos (Kurta et al., 1989) y por otra parte, la preparación para contender con las demandas impuestas por la ejecución de un

aletargamiento fisiológico (torpor o hibernación, dependiendo de la especie) durante el periodo invernal (Körtner et al., 2000)

Una de las estrategias reproductivas que ha sido reportada en varias especies vespertilionidos hibernantes, es la fertilización postergada, en la cual, tras los apareamientos que comúnmente ocurren en el otoño previo al inicio del periodo de aletargamiento, el esperma es almacenado en el tracto genital (útero) de la hembra después de la inseminación, y la ovulación es suspendida varias semanas hasta el final del periodo invernal (Racey, 1975; Baer et al., 2006; Das et al., 2006; Wang et al., 2008). De esta forma, la fertilización y la gestación ocurren después de la temporada de hibernación y la hembra garantiza que sus crías nazcan en la temporada de primavera, que es la más favorable, tanto climáticamente, como en términos de disponibilidad de insectos de los cuales se alimentan (Mateos, 1995; Bradley, 2007).

Myotis velifer es una especie monoéstrica, por lo que presenta un único evento reproductivo al año, el cual incluye estro, preñez y lactancia. Krutzsch, 2009 ha reportado para las poblaciones del norte de Estados Unidos, que la gestación tiene una duración de entre 60 y 70 días, y se han encontrado hembras preñadas de febrero a mayo; también se reportan hembras lactantes de mediados de mayo a inicios de julio (Krutzsch, 2009). Además, se reporta fertilización en el mes de febrero y nacimientos a mediados de mayo (Krutzsch, 2009). *Myotis velifer* es también una especie monotoca, pues las hembras sólo dan a luz a una única cría después del parto (Krutzsch, 2009).

Hibernación

Myotis velifer ha explotado una gran cantidad de refugios, tales como cuevas, túneles mineros, puentes y edificios abandonados; sus poblaciones son numerosas y oscilan entre 2000 y 5000 individuos, y en el la parte norte de su distribución, rara vez se desplazan durante el invierno, aunque algunas poblaciones se mudan a sitios de hibernación normalmente desconocidos a finales del verano-principios del otoño (Tinkle et al., 1965; Davis et al., 1968; Fitch et al., 1981; Harvey et al., 2011).

La mayoría de los vespertiliónidos de zonas templadas y frías llevan a cabo un torpor profundo o hibernación durante el invierno, durante el cual el metabolismo es reducido (Fitch et al., 1981). La hibernación es considerada una forma extendida del torpor que depende de la temperatura, de la disponibilidad de alimento, e inclusive de la precipitación pluvial durante el periodo de lluvias (Körtner et al., 2000). *Myotis velifer* es considerada una especie hibernante estricta (Fitch et al., 1981), por lo que durante el invierno reduce su actividad locomotriz y el consumo de alimentos. Un aspecto interesante que ha sido sugerido, pero que requiere probarse, es que algunas poblaciones de *M. velifer* en el centro de México, llevan a cabo desplazamientos geográficos, posiblemente en el eje altitudinal, entre los 1000 y los 3000 msnm (Villa, 1967; Arratia, 2000), posiblemente debido a su necesidad de realizar una hibernación durante el periodo invernal en zonas altas. De esta manera, las cópulas en los murciélagos *M. velifer* suelen ocurrir durante el otoño tardío, aunque puede variar entre las

diferentes poblaciones de acuerdo a su localización geográfica, mientras que la gestación y lactancia la realiza en zonas de altitud menor (Kruttsch, 2009).

Los desplazamientos

La migración estacional en murciélagos, es un fenómeno que ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, se desconoce cómo los murciélagos “planean” la migración respecto a sus requerimientos energéticos, temporalidad y rutas que deben seguir (Popa-Lisseanu et al., 2009).

Los murciélagos de diversas especies de zonas templadas, migran hacia sitios con condiciones ambientales favorables en respuesta a condiciones climáticas adversas, mientras otros que permanecen en los mismos sitios, llevan a cabo un torpor o bien una hibernación. Inclusive, algunos murciélagos de zonas tropicales, suelen migrar para compensar la falta de alimento, a zonas con mayor disponibilidad de nutrimentos y cubrir sus demandas energéticas (Strelkov, 1969).

Cualquier movimiento implica un gasto energético, el cual se obtiene a partir de las reservas energéticas almacenadas (Alerstam et al., 2003). La acumulación de grasa en murciélagos de zonas templadas puede ser muy rápido, por ejemplo, las hembras de *M. thysanodes* son capaces de aumentar nueve veces su grasa corporal en tan solo once días (Popa-Lisseanu et al., 2009).

La grasa almacenada cumple dos funciones, permite a los murciélagos realizar la migración y además es útil en la hibernación, en los murciélagos de zonas templadas mayor cantidad de grasa es destinada para la hibernación que para la

migración, mientras que en los murciélagos de distribución tropical ocurre lo inverso (Popa-Lisseanu et al., 2009).

La cantidad de grasa almacenada puede variar notoriamente a lo largo del ciclo anual, por ejemplo, en el murciélago norteamericano *M. grisescens*, que inverna por seis meses, tanto en hembras como en machos, el contenido de grasa incrementa en los meses de septiembre y octubre, representando un aumento en la masa corporal hasta de 26% (Popa-Lisseanu et al., 2009). La migración también suele estar relacionada con el sexo, ya que las hembras de la mayor parte de las especies migratorias se desplazan mayores distancias que los machos (Fleming et al., 2003). Además de la migración y de la hibernación, otro evento que requiere un gran gasto energético es la lactancia (Kurta et al., 1989).

La lactancia y las crías

La lactancia es una fase crítica en los mamíferos, ya que una gran cantidad de energía es invertida para asegurar la alimentación y por ende, la sobrevivencia de las crías. La mayoría de las especies sostienen los requerimientos nutrimentales de la producción de leche mediante el incremento de la cantidad de alimento que consumen. En los microquirópteros, del 20 al 40% de la energía materna es destinada a la producción de leche y aunque la cantidad de grasa que pueden almacenar es limitada respecto a otros mamíferos de mayor talla, en el caso de *M. velifer*, se ha reportado que las hembras adultas consumen cantidades de alimento mucho mayores que los machos y gran parte de su dieta, que está

compuesta principalmente de escarabajos (Coleoptera) y polillas (Lepidoptera), es destinada a su almacenamiento en forma de grasa (Kunz, 1974; Webb et al., 1992).

Estudios efectuados en *M. lucifugus* indican que, una hembra gestante requiere un promedio estimado de 1048.9 KJ de energía asimilada para mantener el embarazo, mientras que en la lactancia requiere de 1285.46 KJ (Kurta et al., 1989). Para sustentar este aporte energético, una hembra gestante, con 9 g de masa corporal debe consumir en promedio 171.19 g de insectos durante un periodo de gestación de aproximadamente 2 meses, mientras que durante la lactancia, que abarca un lapso de tiempo similar, una hembra de 7.9 g debe realizar un consumo promedio de 208.53 g de insectos para satisfacer sus necesidades energéticas, asignando el 32% de esta energía a la producción de leche.

La duración de la lactancia es muy variable entre los diferentes grupos de mamíferos, siendo relativamente más corta en los Euterianos pues las crías nacen en un estado bastante avanzado del desarrollo en comparación con los Metaterianos (Lillegraven et al., 1987). La duración promedio del periodo de lactancia en la familia Vespertilionidae es de 40.9 días (Hayssen et al., 1993; Barclay et al., 2003), pero varía dependiendo de la especie, en función del tiempo que tardan las crías en desarrollarse y alcanzar la autosuficiencia. En algunas especies, se presentan diferencias incluso entre individuos, como es el caso de *Phyllostomus hastatus*, donde para algunas hembras, la lactancia ha finalizado

poco después de los 90 días, mientras que otras continúan produciendo cantidades significativas de leche después de los 100 días (Stern et al., 1997)

La tasa de crecimiento de las crías está asociada directamente con la capacidad de la madre para proveer nutrientes, por lo cual la composición de la leche provee una medida directa de la inversión materna durante la lactancia. En *P. hastatus*, se ha registrado que el porcentaje de grasa de la leche incrementó de 9 a 21% a través de la lactancia y la cantidad de proteínas aumentó del 6 al 11% del inicio al pico de la lactancia. También se ha reportado que en esta especie, los carbohidratos presentes en la leche constituyen una fuente de energía secundaria, ya que el principal aporte nutricional para la cría está dado por los lípidos (Pond, 1977; Stern et al., 1997). Mientras que en ratas, la grasa consumida por la madre produce un aumento en los ácidos grasos de la leche, lo cual impacta en el aumento de la masa corporal de las crías lactantes y su capacidad termogénica (Priego et al., 2013).

El aporte de calcio en la leche es importante para el desarrollo de los tejidos mineralizados (huesos y dientes). En la dentición de los murciélagos, al igual que en la mayoría de los mamíferos, el patrón observado es la difiodoncia, donde las crías nacen con un complemento especial de dientes generalmente más débiles y pequeños llamados dientes deciduos (Dahlberg, 1971).

El reemplazamiento de la dentición ha sido descrito para varias especies de microquirópteros, ya que en este grupo la dentición primaria difiere notoriamente de la secundaria, tanto morfológica como numéricamente. La dentición primaria

en murciélagos cumple la función de permitir a las crías anclarse a sus madres, para poder llevar a cabo esta función de manera adecuada, su morfología es muy particular, presentando forma de gancho. La pérdida de esta dentición y la adquisición de la dentición secundaria, suele estar relacionada con el final de la lactancia (Adams et al., 2000).

A lo largo de la lactancia, las crías se encuentran adheridas al pezón de la madre mediante la dentición primaria de manera continua, y maman durante el día y la noche (Crichton et al., 2000). En *M. velifer*, las crías suelen mamar hasta que han alcanzado un tamaño corporal considerable, e incluso se ha reportado que las hembras siguen amamantando a las crías después de haber alcanzado la capacidad de vuelo (Pearson et al., 1952; Twente, 1955; Kulzer, 1962; Davis et al., 1968; Davis, 1969; Hughes et al., 1989; McCracken et al., 1991; Bishop et al.; 1992; Balmori, 1999).

La glándula mamaria

La glándula mamaria es el órgano considerado como la característica distintiva que le da el nombre al grupo de los Mamíferos, debido a que es la estructura que se encarga de producir el único alimento que le confiere la nutrición a la cría en la etapa inicial de su vida. Es una glándula exócrina, compleja en su desarrollo y en su regulación, al ser uno de los pocos órganos que pueden experimentar crecimiento, diferenciación funcional y regresión repetitivamente (Gleiman, 2003; Wade, 2011).

A lo largo del ciclo reproductivo, la glándula presenta cambios estacionales inducidos por las hormonas provenientes de la hipófisis, del ovario y de la placenta antes del parto. Las hormonas placentarias como la progesterona y los estrógenos estimulan el desarrollo de las mamas pero inhiben la producción de leche, que sólo se produce tras el nacimiento gracias a la oxitocina, secretada por el lóbulo posterior de la hipófisis. Durante la lactancia, la glándula mamaria recibe un aporte sanguíneo abundante y es la prolactina una de las hormonas que mayor influencia ejercen sobre la fisiología glandular (Henninghausen et al., 1997).

Los cambios estacionales en la glándula mamaria varían en los mamíferos, en algunos grupos no se aprecian cambios macroscópicos e histológicos importantes a lo largo de su ciclo reproductivo, por ejemplo, los bovinos, sobre todo los domésticos que han sido extensamente estudiados por su importancia económica como productores de leche (Capuco et al., 1999); mientras que otros experimentan un desarrollo e involución marcados, como es el caso de los murciélagos y roedores (figura 2).

La glándula mamaria comprende células estromales y epiteliales que se comunican entre sí a través de la matriz extracelular (ECM). La ruptura de la comunicación entre el estroma y el epitelio puede inducir cáncer de mama (Wiseman et al., 2002). El estroma es tejido conectivo, de ahí la gran importancia de su ECM. Presenta múltiples componentes celulares, tales como pre-adipocitos, adipocitos, fibroblastos, macrófagos, células inflamatorias, así como vasos sanguíneos.

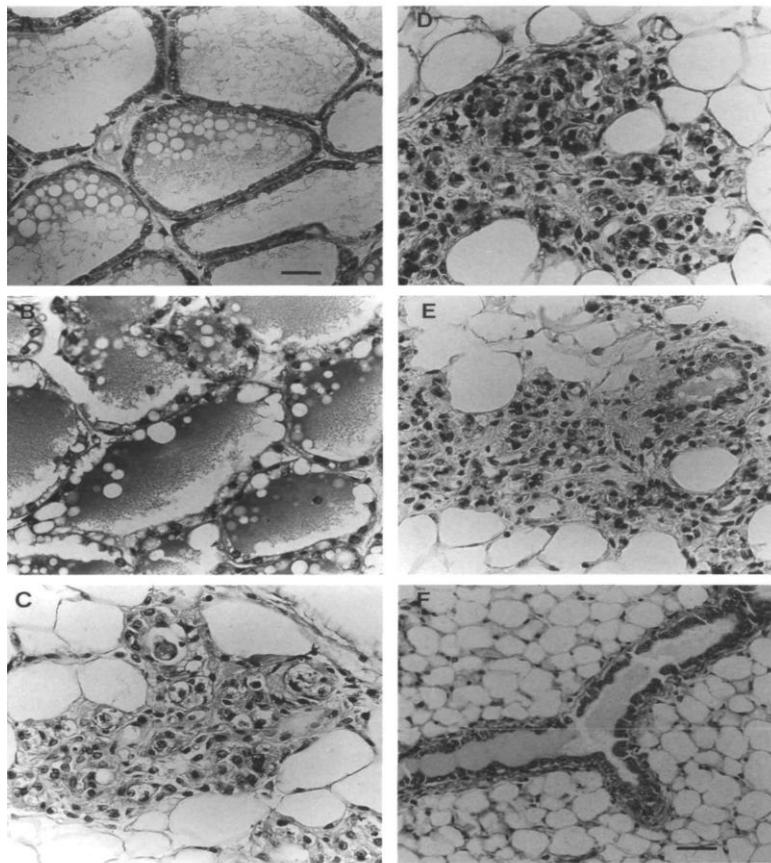


Figura 2. Desarrollo de la glándula mamaria de ratón a lo largo del ciclo de la glándula mamaria. Tinción con H-E. Glándula mamaria lactante (A), 2 días (B), 4 días (C), 6 días (D) y 8 días después de la lactancia (E) y glándula mamaria en reposo. Escala: 50 micras (A), 100 micras (F) (Strange et al., 1992).

Por su parte, el epitelio presenta dos capas: la capa externa, integrada por las células mioepiteliales capaces de expulsar productos de secreción al exterior de la glándula, que rodean a estructuras parenquimales denominadas alvéolos, considerados la estructura morfológica primaria de la glándula mamaria. La capa interna, que constituye el límite de los alvéolos, está integrada por células cuboidales epiteliales secretoras de leche. Desde los alvéolos, la leche es expulsada a través de los ductos lactíferos hacia el pezón (Francis et al., 1994; Streuli et al., 1995; Wiseman et al., 2002; Sternlicht, 2006; Visvader, 2009; Muschler et al., 2010; Watson et al., 2011). Las estructuras alveolares se

encuentran invadiendo las almohadillas de grasa mamarias. Cada almohadilla de grasa presenta un pezón externo al cual se encuentra conectado el ducto epitelial primario para permitir la liberación de leche durante el amamantamiento (Richert et al., 2000).

La mayor parte del crecimiento de la glándula mamaria ocurre posnatalmente, iniciando con el comienzo de la pubertad (Richert et al., 2000). El crecimiento de la glándula puede dividirse en tres fases principales:

La primera fase ocurre posterior al nacimiento, y consiste en la invasión de una estructura ductal rudimentaria a la almohadilla de grasa mamaria (Richert et al., 2000). Esta estructura epitelial permanece en reposo hasta que los ovarios comienzan a secretar hormonas. Es en esta etapa en la que aparecen las yemas terminales y comienza el proceso de elongación de los ductos. (Daniel et al., 1987).

La segunda fase es iniciada durante la pubertad e implica el crecimiento de los ductos. Durante esta fase ocurre el elongamiento y ramificación del epitelio, el cual se extiende hasta los límites de la almohadilla de grasa. Por último, la tercera fase que recibe el nombre de mamogénesis y se conoce como diferenciación alveolar, consiste en el desarrollo que ocurre a lo largo del ciclo reproductivo, específicamente durante el embarazo y culmina en la lactancia, implicando la formación de unidades secretoras de leche (Richert et al., 2000; Wade, 2011). Durante este periodo, el tejido adiposo es gradualmente remplazado por ductos, alvéolos, vasos sanguíneos y tejido conectivo por la acción de los estrógenos y la progesterona. Los alvéolos no están formados antes del establecimiento del embarazo, por lo cual la proliferación y extensión de los ductos y alveolos

continúa durante el resto del embarazo, y el aumento del tamaño de la glándula se debe principalmente a la acumulación de productos de secreción en los alvéolos (Wade, 2011). Al final del embarazo, las células epiteliales alveolares comienzan a producir los lípidos y proteínas de la leche, la acumulación de lípidos produce un aumento en sus dimensiones (Mather et al., 1998) y las células mioepiteliales que rodean a los alvéolos se vuelven menos continuas, por lo que las células epiteliales entran en contacto directo con la membrana basal; dicho contacto es sumamente importante para la secreción láctica (Lee et al., 1985; Barcellos-Hoff et al., 1989; Ferguson et al., 1992; Adams et al., 1993; Howlett et al., 1993; Richert et al., 2000). La cantidad de estroma también disminuye durante esta etapa, aumentando el contacto del epitelio con los adipocitos. En esta etapa aproximadamente el 30% del tejido mamario de ratón está conformado por adipocitos y el lumen se encuentra lleno de leche (Richert et al., 2000). Al inicio de la lactancia, las células mioepiteliales forman una capa discontinua alrededor de cada alveolo, realizando procesos dendríticos en respuesta a la oxitocina para liberar la leche fuera del alveolo y los conductos lactíferos (Asch et al., 1985; Dulbecco et al., 1986) Conforme avanza la lactancia, los alvéolos se expanden abarcando toda la superficie de la glándula, y la grasa en los adipocitos es metabolizada (Richert et al., 2000). Esto es acompañado por la generación de vasos sanguíneos (angiogénesis) siendo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) uno de los estímulos más importantes para que se lleve a cabo este proceso (Rang et al., 2008).

El desarrollo de la glándula mamaria es regulado por una interacción dinámica de factores locales y endócrinos (Matsuda et al., 2004). El desarrollo hormono-dependiente de la glándula ocurre después de la pubertad. A partir de este momento el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria se encontrará regulado por diversas hormonas: la progesterona, que induce el crecimiento de los alvéolos (Martinet et al., 1999; Brisken et al., 2010), los estrógenos, que estimulan la proliferación y diferenciación de los ductos lactíferos (Malgor et al., 2005), la prolactina, responsable del crecimiento y diferenciación de los alvéolos, así como de la diferenciación de los ductos (Martinet et al., 1999), la hormona del crecimiento (GH) y la oxitocina que participan en la galactopoyesis, y la Insulina, que juega un papel importante en la regulación de la secreción de la leche en rumiantes, roedores y humanos, y además parece tener un efecto importante en la proliferación celular (Mills et al., 1970; Muukherjee et al., 1973; Bequette et al., 2001). Tanto la prolactina como la oxitocina son secretadas en respuesta a la estimulación del pezón durante el amamantamiento y mientras que la prolactina es esencial para la iniciación y mantenimiento de la lactación, la oxitocina es de gran importancia para la expulsión de la leche (Lawrence et al., 1999; Stull et al., 2007).

El origen de la glándula mamaria

Diversas teorías han tratado de explicar el origen de la glándula mamaria y de su secreción. Se ha sugerido que la glándula mamaria pudo haber surgido a partir de algún otro tipo de glándula de la piel, ya sea sebácea, sudorípara, o apócrina. Es

posible también que la glándula mamaria haya surgido como una estructura que combina características de glándulas apócrinas y sebáceas. Mientras que la lactancia pudo haber surgido para promover la supervivencia de la cría, o bien, pudo haber tenido una función diferente, como mantener al huevo húmedo a través de las sustancias de secreción, promoviendo su incubación (Blackburn, 1991; Oftedal, 1992).

Los sinápsidos se encuentran entre los primeros amniotas en el registro fósil. En el triásico tardío, surgieron por primera vez sinápsidos con características propias de los mamíferos. Los mamíferos verdaderos inicialmente radiaron durante el Jurásico y el Cretácico, diversificándose en el Terciario después de la extinción de los dinosaurios. La lactancia evolucionó en algún punto de este largo periodo, en respuesta a presiones de selección que favorecieron el aumento de la inversión parental en el desarrollo de las crías. Entonces, el desarrollo de la glándula, probablemente haya ocurrido gradualmente junto con el desarrollo de otras características propias de los mamíferos, tales como el desarrollo mandibular, la diversificación de los dientes y cambios en la postura. Al parecer, las glándulas primitivas de los sinápsidos eran multicelulares, asociadas en varios casos con contracción de células mioepiteliales para secretar lípidos y fluidos que minimizaban la pérdida de agua (Oftedal, 2002)

Al presentar similitudes con glándulas apócrinas, sebáceas y sudoríparas, el origen de la glándula mamaria es incierto, ya que la ausencia de estructuras que representen un grado intermedio, el largo periodo de evolución de la glándula y la ausencia de evidencia fósil dificulta la validación de cualquier teoría (Oftedal, 2002).

Particularidades de la glándula mamaria en murciélagos

Se ha observado que los humanos presentan mayor similitud histológica de la glándula mamaria con los murciélagos que con otros grupos de mamíferos como los roedores, esto hace a los murciélagos un modelo adecuado para estudiar la fisiología de la glándula mamaria aplicada al ser humano (Evarts et al., 2004).

En los murciélagos, la posición de las mamas varía de acuerdo a la especie y a la conducta de amamantamiento. Puede ser axilar, como es el caso de *M. velifer* (figura 3), mientras que otros presentan una posición pectoral. La mayor parte de las especies de murciélagos, incluyendo a *M. velifer*, presentan un par de glándulas mamarias, sin embargo existen dos géneros de vespertiliónidos, *Lasiurus* y *Otonycteris*, que poseen dos pares de glándulas funcionales.



Figura 3. Apariencia externa de la glándula mamaria en *M. velifer*.

Este patrón se encuentra presente en especies politocas, con un número de crías superior a dos (Nowak, 1994; Crichton et al., 2000).

En los murciélagos estacionales, la glándula mamaria presenta una serie de cambios a lo largo del ciclo reproductivo caracterizado por el reinicio del desarrollo, una marcada evolución para establecer la temporada lactacional y posteriormente, una abrupta involución hasta quedar en una condición inactiva que morfológicamente se asemeja a la condición juvenil (Heideman, 1998; Neuweiler, 2000).

Externamente, las glándulas mamarias adquieren su mayor tamaño durante la lactancia, presentándose unos pezones prominentes de color marrón oscuro y desapareciendo el pelo en esta zona. Al finalizar este periodo los pezones dejan de ser conspicuos y el pelo oculta totalmente a las glándulas (Balmori, 1999). Los pezones de las hembras nulíparas o jóvenes suelen ser rudimentarios, mientras que en las hembras adultas se encuentran cornificados y de color oscuro o amarillento, con poco pelo alrededor (Pearson et al., 1952; Sluiter, 1954; Racey, 1974, 1988; Baage, 1977). Al realizar una disección, la glándula mamaria puede ser reconocida como un tejido blanquecino ubicado directamente bajo la piel (Racey, 1988; Kunz et al., 1996).

La masa de la glándula mamaria en los murciélagos suele ser substancial; en *Tadarida brasiliensis* se ha registrado que la glándula llega a representar hasta el 8% de la masa corporal de la hembra, y en algunos murciélagos puede representar un mayor porcentaje (Davis et al., 1962).

Mediante una combinación de criterios, incluyendo el tamaño relativo del pezón, la presencia o ausencia de pelo en la glándula y el grado de cornificación del pezón,

es posible asignar a las hembras estados relativos de lactancia y post-lactancia (Heideman, 1988; Kunz et al., 1996; Crichton et al., 2000).

Particularmente en la especie *M. velifer*, la glándula mamaria experimenta cambios estacionales marcados tanto morfológicamente como en su actividad y por tanto, es un modelo donde ocurre reactivación, desarrollo, actividad, involución y una fase de reposo, durante un ciclo anual, lo cual permite acceder al estudio del control de cada uno de estos procesos de manera bien establecida.

La involución de la glándula mamaria

La involución de la glándula está acompañada por muerte celular por apoptosis, un proceso que implica la eliminación ordenada de células en ausencia de reacción inflamatoria (Gavrieli et al., 1992; Collins et al., 1997; Terranova et al., 1999). Este tipo de muerte celular se encuentra programada a nivel genético (Willingham, 1999). Los cambios morfológicos de las células durante la apoptosis incluyen el encogimiento celular por la reducción de la cantidad del citoplasma y la ruptura nuclear (Terranova, 1999). La remodelación de la glándula mamaria después de la lactancia es sustancial, ya que durante la involución el 90% del epitelio muere a través de la apoptosis y las células adiposas sustituyen este tejido (Wiseman et al., 2002).

La involución de la glándula ha sido descrita como un proceso en dos pasos, de acuerdo a su reversibilidad (Watson, 2006). La primera fase, que se ha descrito en ratones tiene una duración de 48 horas, es reversible e inducida por factores

locales, como el factor de crecimiento TGFbeta3 (Li et al., 1997; Nyugen et al., 2000). Durante esta fase ocurre la inducción de apoptosis mediante la acumulación de leche (Torsten et al., 2007). En la segunda fase, la apoptosis es acompañada por la remodelación del estroma circundante y el programa de remodelación regresa a la glándula a un estado pre-puberal (Pitelka, 1988; Strange et al., 1992; Lund et al., 1996).

Histología de la glándula mamaria

Se han realizado escasos estudios a nivel histológico en la glándula mamaria de murciélagos, entre ellos destaca un estudio en el cuál se compara la morfología de la glándula mamaria del murciélago *Carollia perspicillata* con la del ratón *Mus musculus* a través de métodos histológicos e histoquímicos. Los resultados de este estudio demostraron que la glándula mamaria del ratón presenta mayor cantidad de adipocitos y menor cantidad de tejido conectivo colagenoso a diferencia de la glándula del murciélago (Evarts et al., 2004).

Para las subespecies norteñas de *M. velifer* se han realizado algunos estudios sobre lactancia, incluyendo el análisis de la composición de la leche, donde el porcentaje de lípidos se compara con el correspondiente para las especies *M. lucifugus* y *T. brasiliensis* (kunz, 1995). En dicho estudio se encontró un porcentaje de 8 a 20% de lípidos en la leche de *M. velifer*, y una composición similar para otras dos especies. Los resultados obtenidos se relacionaron con la dieta, forrajeo y velocidad de vuelo, y fueron enfocados a analizar la relación de

las características nutrimentales de la leche con el aporte calórico que le ofrecen a la cría para dirigir su desarrollo postnatal. Sin embargo, no se han realizado estudios histológicos ni funcionales en la glándula mamaria para el murciélago *M. velifer*, así como tampoco se han analizado aspectos de regulación del desarrollo glandular en el individuo adulto.

La serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) es uno de los neurotransmisores más conocidos a nivel del sistema nervioso central (SNC), es sintetizada a partir de su precursor L-triptófano a través de la acción de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH1: periférica, TPH2: central), la cual cataliza la monooxigenación del triptófano a hidroxitriptofano (5-HTP), mismo que después es descarboxilado a 5-HT.

La 5-HT regula gran cantidad de procesos biológicos y es reconocida por sus efectos neurofisiológicos (Whitaker-Azmitia, 1999; Berger et al., 2009), sin embargo, en los últimos años se ha mostrado que la 5-HT realiza funciones importantes fuera del SNC, incluyendo funciones endócrinas y reproductivas (Berger et al., 2009). Específicamente, se ha estudiado su papel como regulador local de la homeostasis durante la lactancia, ya que regula la secreción y la involución de la glándula mamaria mediante señalización autócrina y parácrina (Matsuda et al., 2004; Marshall et al., 2010). La serotonina es responsable de la homeostasis de volumen intraluminal, un fenómeno fisiológico común en glándulas endócrinas y exócrinas que involucra la regulación de la secreción y

almacenamiento de fluidos para garantizar un funcionamiento eficiente (Vaibhav et al., 2011). La 5-HT regula el volumen de los espacios alveolares, reduciendo el tamaño de los alveolos durante la involución, suprimiendo y regulando la secreción láctica, por lo que su papel es antagónico al de la prolactina (Matsuda et al., 2004).

El proceso por el cual la 5-HT inhibe la secreción láctica es el siguiente: la 5-HT se acumula en el fluido intersticial que rodea el epitelio secretorio mamario y es funcional a través de su unión con los receptores 5-HT₇. El mecanismo responsable de este proceso es la apertura de las uniones estrechas o *zonula occludens*, que disipan los gradientes transepiteliales necesarios para la secreción de leche, siendo uno de los eventos tempranos del proceso de involución de la glándula (figura 4).

La 5-HT actúa a través del receptor 5-HT₇, mismo que se encuentra acoplado a proteínas Gs. La adenilato ciclasa es una liasa que transmite la señal desde el exterior a través de la formación del segundo mensajero AMPc a partir de una molécula de ATP. El AMPc da lugar a dos señales: cAMP-PKA y cAMP-P38, que actúan sobre las uniones estrechas. La función que llevan a cabo estas señales es bifásica, ya que al inicio de la lactancia fortalecen las uniones estrechas, pero después de una exposición prolongada, causan su ruptura, dando inicio al proceso de involución e inhibiendo la secreción láctica. Este proceso está acompañado de presión intraluminal causada por la acumulación de leche (Vaibhav et al., 2008; 2011).

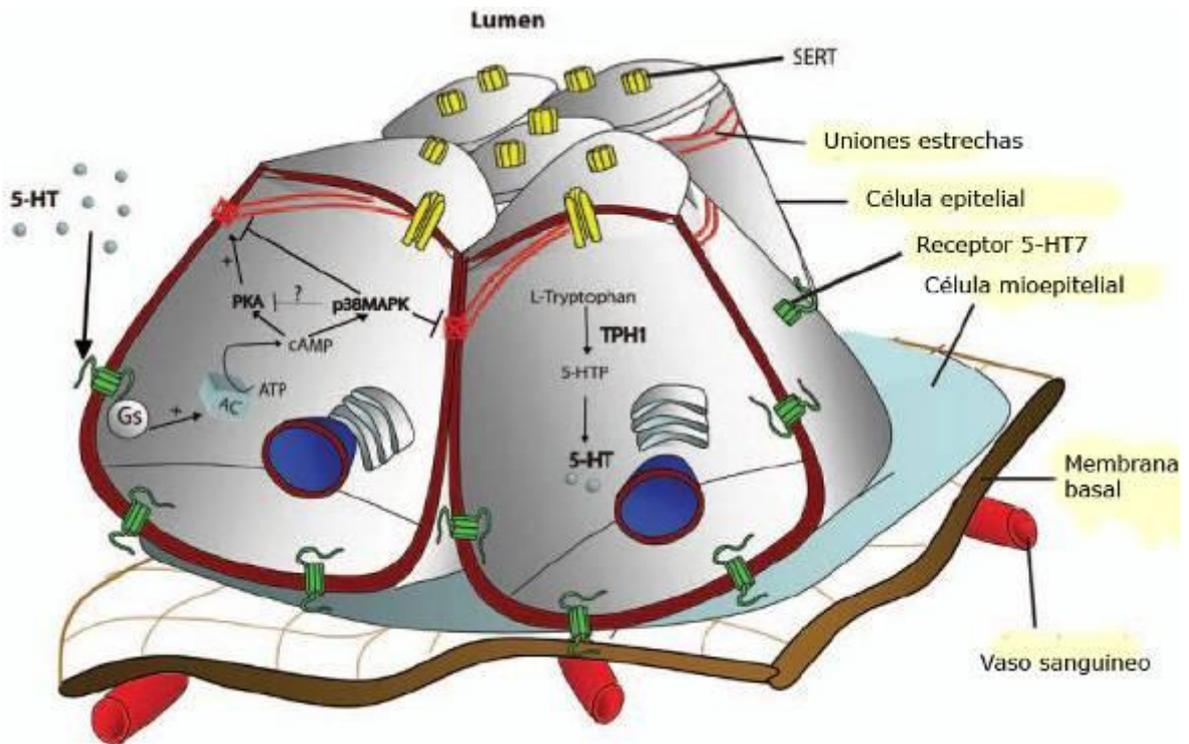


Figura 4. Sistema epitelial de Serotonina mamaria, en el que se esquematiza su metabolismo y mecanismo de acción a través del receptor 5-HT7 (modificado de Vaibhav et al., 2011)

Matsuda y colaboradores (2004), demostraron que la glándula mamaria de ratón, estimulada por prolactina (PRL), expresa genes esenciales para enzimas que participan en la biosíntesis de 5-HT, como la triptófano hidroxilasa (TPH), cuyo nivel se eleva durante la lactancia y el embarazo. También se reconoce que la 5-HT suprime la expresión genética del ARNm de β -caseína y causa encogimiento en los alveolos mamarios (Matsuda et al., 2004). Por otro lado, el transportador de 5-HT (5-HT_T o SERT) es una proteína que se localiza en la membrana apical de las células epiteliales de la glándula mamaria y está involucrado en el reciclaje y metabolismo de la 5-HT, a la que internalizan (Vaibhav et al., 2011). Marshall y colaboradores (2010), realizaron una cuantificación de SERT en distintas etapas del desarrollo de la glándula del ratón, encontrando una mayor concentración de

éste transportador durante la lactancia e involución, cuyo marcaje fue observado en el estroma mamario, en elementos tanto vasculares como no vasculares.

La enzima Monoamina oxidasa (MAO) es una flavoenzima mitocondrial que cataliza la alfa-carboxilación de aminas, es conocida por su acción en la catalización de agentes farmacológicos y la metabolización de tiramina, octopamina y triptamina (Bissel et al., 2002). Esta enzima se encuentra presente en la membrana externa de la mitocondria, en un gran número de células de los mamíferos, incluyendo los fibroblastos. Cumple una gran cantidad de funciones neuroendócrinas y regula niveles de neurotransmisores. La MAO presenta dos formas, la MAO-A y la MAO-B, siendo la MAO-A la encargada de la degradación de la 5-HT a través de su oxidación, esta característica, hace a la MAO-A otro componente importante del sistema serotoninérgico (Holschneider et al., 2000; Marshall et al., 2010; Vaibhav et al., 2011). Se ha reportado además, que MAO-A participa en el proceso de muerte celular por apoptosis iniciado en las mitocondrias en el SNC (Naoi et al., 2006).

Aunque se han realizado estudios en murciélagos que analizan la presencia y participación de la 5-HT a nivel del SNC (Hurley et al., 2001; Maseko et al., 2007; Dell et al., 2010; Ganesh et al., 2010), únicamente se ha realizado un estudio en órganos sexuales, particularmente en testículo de *M. velifer*, realizado por nuestro grupo de investigación (Jiménez-Trejo et al., 2013), pero no se ha estudiado en la glándula mamaria de ninguna especie de murciélago hasta el momento, por tal motivo, el presente trabajo resulta de gran importancia ya que se propone realizar el primer estudio sobre la detección y variación en los niveles de algunos de los

principales componentes del sistema serotoninérgico en la glándula mamaria de una especie de murciélago monoéstrica estacional.

Justificación

La importancia de realizar estudios de reproducción radica en que nos permite contar con más elementos para entender a estos organismos y poder realizar labores adecuadas para conservación. La reproducción en las especies es uno de los procesos biológicos fundamentales de entender, sobre todo porque es a través de ésta que las especies se perpetúan a lo largo del tiempo.

El conocimiento de la biología de la reproducción de los murciélagos que habitan en México requiere de mayores esfuerzos, ya que los estudios son escasos y es necesario integrar y recopilar la información existente. Parte de la importancia del estudio de los aspectos reproductivos en especies estacionales consiste en el hecho de que pueden analizarse estructuras y órganos que en las especies de reproducción continua, incluyendo al humano, presentan cambios poco perceptibles y en ocasiones sólo se puede acceder al análisis de las variaciones a través de la manipulación de factores de importancia, ya sea en condiciones de bioterio, o de laboratorio, o bien a través de estudios *in vitro*, que no siempre reflejan lo que ocurre bajo las condiciones del hábitat natural.

Realizar un estudio descriptivo de la glándula mamaria a nivel histológico en el murciélago estacional *Myotis velifer* servirá como un modelo que permitirá analizar y comparar diferentes aspectos del desarrollo y la regulación de la

glándula mamaria para los mamíferos en general, con posibles aplicaciones incluso para el humano. Este murciélago de amplia distribución en la República Mexicana, puede considerarse como un modelo adecuado al tratarse de una especie, que presenta un ciclo reproductivo interesante y complejo, donde las hembras retienen el esperma y se mantienen anovulatorias por un lapso largo de tiempo mientras transcurre la hibernación, y posteriormente, tras el despertar permanente, llevan a cabo la ovulación y ocurre la fertilización, entonces aceleran el desarrollo embrionario ya en la primavera y experimentan marcados cambios en la glándula mamaria que incluyen una reactivación, un intenso desarrollo y al término de la etapa lactacional, una drástica involución hasta llegar a una condición semejante a la del individuo juvenil inmaduro. Esos cambios en la glándula mamaria son mucho más notorios y drásticos comparativamente con los observados para la mayoría de los mamíferos conocidos, incluyendo los roedores de laboratorio. Por lo tanto, el análisis de uno de los diferentes componentes neuroendócrinos que participan en la regulación del desarrollo y funcionamiento de la glándula mamaria en el murciélago *M. velifer*, se presenta como un estudio interesante que puede aportar información importante para ampliar el conocimiento básico que se tiene sobre la regulación de la glándula mamaria en los mamíferos en general.

Preguntas de Investigación

- a) ¿Cuánto dura, en qué fechas, y en qué sitio ocurre la lactancia en *Myotis velifer*, en poblaciones que habitan en el centro de México, particularmente en localidades ubicadas a lo largo de un gradiente altitudinal de la Sierra Norte de Puebla? ¿Ocurre lo mismo que se reporta para las poblaciones del Norte?
- b) ¿Existe una relación entre la variación en la masa corporal de las hembras y la lactación?
- c) ¿Cuáles son los principales cambios macro y microscópicos de la glándula en las principales etapas del ciclo reproductivo de la especie?
- d) ¿cómo es la distribución y expresión de los componentes del sistema serotoninérgico en la glándula mamaria de las hembras en el murciélago *M. velifer*? ¿cuál es la posible participación de dichos componentes en la regulación de la glándula en las etapas de actividad e involución durante la fase lactacional de la especie?

Hipótesis

Para las poblaciones de *M. velifer* de estudio, la lactancia deberá ocurrir cuando los individuos se encuentran en la localidad ubicada a 1420 msnm (cueva Chicomostoc). La glándula mamaria deberá tener actividad durante aproximadamente 5 meses, que transcurren desde principios de marzo cuando

ocurre el embarazo, hasta finales de julio - principios de agosto, cuando se da el destete de las crías y comienza la partida del refugio.

La lactancia requiere una gran cantidad de energía que deberá ser almacenada en forma de grasa, y puede cuantificarse a través de un incremento en la masa corporal antes del inicio del periodo de lactancia y una pérdida de masa corporal a lo largo de este proceso. Los cambios en la morfología externa de las mamas en *Myotis velifer* deberán estar asociados a las características histológicas de la glándula en los principales procesos (reinicio, desarrollo, lactancia e involución) que conforman su ciclo.

La mayor expresión de los componentes del sistema serotoninérgico en estudio (5-HT, TPH y MAO-A) deberá ocurrir durante la lactancia, ya que se requiere la participación de 5-HT para fortalecer las uniones estrechas de las células epiteliales de la glándula mamaria al inicio de este proceso.

Objetivo general

Determinar el periodo de lactancia de *M. velifer*, incluyendo la descripción macro y microanatómica de la glándula mamaria, sus cambios a lo largo del ciclo anual, y la expresión de tres componentes del sistema serotoninérgico como parte del sistema de regulación de la glándula.

Objetivos particulares

- a) Establecer el periodo de lactancia para *M. velifer* y ubicar en cuál de las tres localidades ocurre, en la región de estudio (Centro de México).
- b) Determinar la probable relación entre la variación en la masa corporal de las hembras y la lactancia
- c) Determinar si existe correspondencia entre las características morfológicas externas de la glándula mamaria, el estatus reproductivo asignado arbitrariamente y las características histológicas de la glándula.
- d) Determinar la presencia y distribución de los marcadores serotoninérgicos (TPH, MAO-A y 5-HT) en la glándula mamaria, y evaluar su expresión entre las condiciones de lactancia, involución y reposo, para aportar información acerca de la participación de la 5-HT en la regulación de la función de este órgano.

Material y métodos

Trabajo de campo

- a) Sitios de estudio

Se seleccionaron tres refugios que albergan poblaciones de *M. velifer* en un gradiente altitudinal entre la Sierra de Tlaxco y la Sierra Norte de Puebla (figuras 7, 8 y 9).

a) El túnel: ubicado en el Cerro Huilapitzo, Sierra de Tlaxco, Tlaxcala (19°37'14" N, 98°02'02" W, a 3220 msnm) (López-Wilchis, 1989). Presenta un clima Templado C; con un intervalo de temperatura media anual de 6.5 a 22° C, y el tipo de vegetación es Bosque mixto de Pino-Oyamel.

b) La Hacienda abandonada "La Almeja" es un refugio antropogénico ubicado a una altitud media entre las otras dos localidades. Se encuentra en el municipio de Aquixtla, Puebla (19°44'16" N y 97°54'47.5" W. 2387 msnm). Con una vegetación secundaria arborea de pino, encino, ocote y roble, la localidad pertenece a la provincia fisiográfica de la Sierra Madre Oriental, en la Subprovincia Carso Huasteco (Rzedowski, 1978). Gran parte de la zona se encuentra perturbada y es utilizada para la agricultura. El clima es templado Subhúmedo Cw, con Lluvias en Verano, de Humedad Media. La temperatura media anual varía entre 12 y 18°C.

c) Cueva Chicomostoc: Ubicada en la parte baja del gradiente altitudinal, esta cueva se localiza en el municipio de Nauzontla, Puebla (19°57'54" N, 97°36'09" W. 1420 msnm). El clima donde se localiza Chicomostoc es Ac, lo que indica que pertenece al grupo de climas templado del subgrupo de los semicálidos con lluvias todo el año. La temperatura media anual de la zona es de 20° C. Presenta una vegetación fuertemente afectada, donde predominan terrenos de cultivo (principalmente maíz) así como algunos pastizales y vegetación ribereña (Camacho, 2002). El grupo de investigación del Dr. López Wilchis y asociados ha reportado la presencia de hembras lactantes en esta localidad.

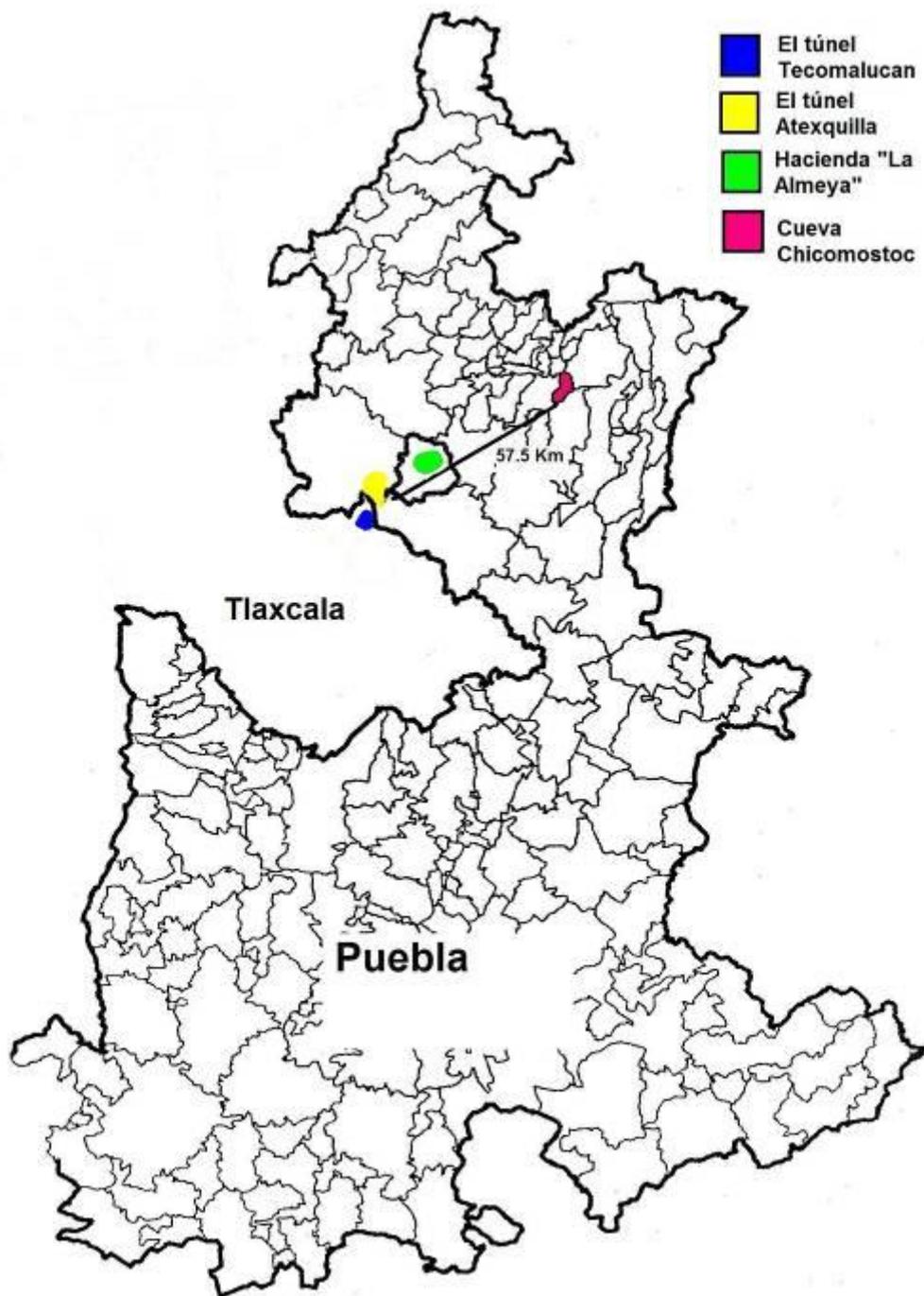
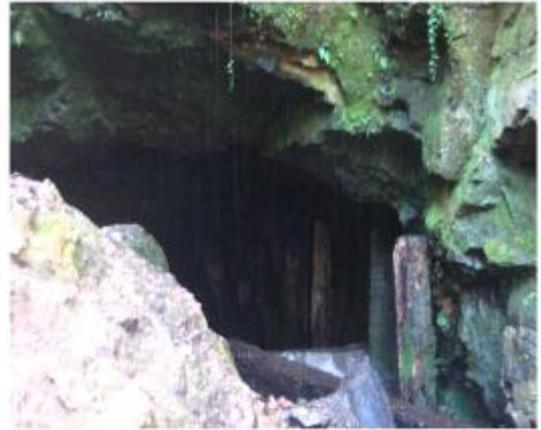


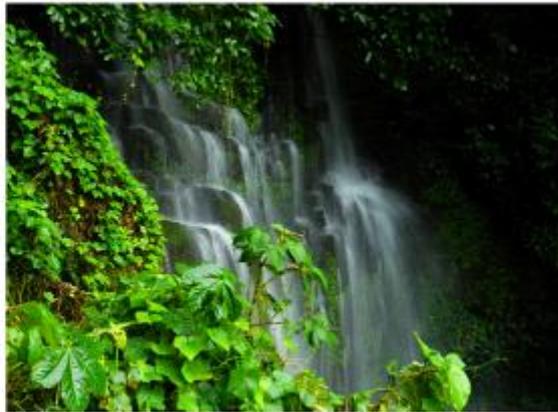
Figura 5. Mapa en donde se muestra la ubicación de los tres sitios de estudio: El túnel (azul y amarillo), la hacienda La Almeya (verde) y la cueva Chicomostoc (rosa).



A



B



C

Figura 6. Fotografías de los sitios de estudio. A: Hacienda "La Almeyra", B: "El túnel", C: Cueva Chicomostoc.

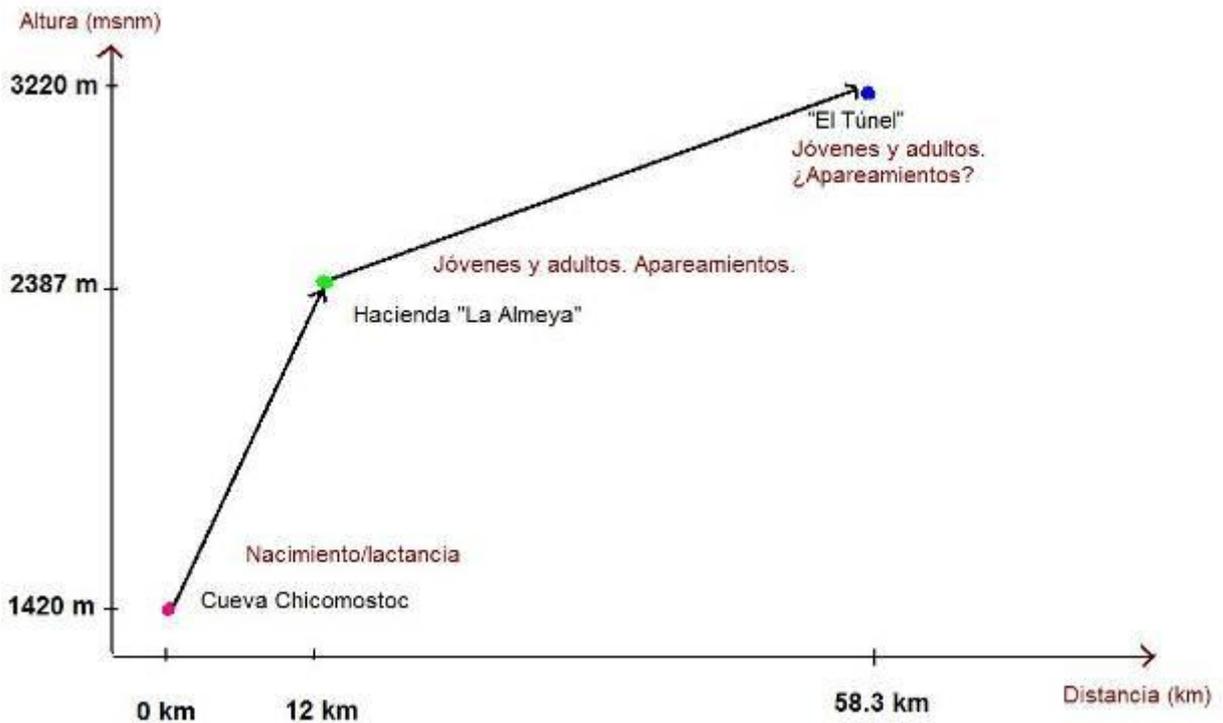


Figura 7. Representación de la distribución altitudinal de los refugios en los que habita *M. velifer*, la distancia entre ellos y los eventos reproductivos que ocurren en cada uno. *Myotis velifer* presenta una dinámica de cambios temporales, por lo que se pueden encontrar individuos en cada una de los refugios únicamente durante un periodo determinado del año.

b) Obtención del material Biológico

Para este estudio se utilizaron las glándulas mamarias completas (tejido glandular, piel y pezón) de hembras adultas de *M. velifer*, los tejidos fueron obtenidos de la siguiente manera:

Para realizar la descripción macroscópica e histológica presentada en este trabajo, se utilizaron glándulas mamarias de hembras adultas capturadas por el grupo de investigación del laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa durante el año 2009 en distintas temporadas del año para cubrir un ciclo anual completo. Los murciélagos fueron obtenidos en las

localidades mencionadas del estado de Puebla y Tlaxcala de acuerdo a los registros previos de presencia/ausencia a lo largo del año.

Las hembras adultas fueron seleccionadas considerando sus medidas somáticas (longitud de antebrazo y peso corporal), así como el que contaran con una completa osificación de las epífisis metacarpal-falangeal del tercer dedo de acuerdo con Anthony (1988). El manejo de los ejemplares de estudio fue realizado de acuerdo con los lineamientos de la sociedad americana de mastozoología para el uso de fauna silvestre en la investigación (Gannon, 2007).

Cabe señalar que *M. velifer* no se encuentra listado en ninguna de las categorías de riesgo dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 para la protección de especies de fauna silvestre (SEMARNAT, 2010) y se encuentra listado dentro de la categoría de menor preocupación por la IUCN, debido a su amplia distribución (IUCN, 2008).

Para realizar la cuantificación y localización de componentes del sistema serotoninérgico, se realizaron tres salidas en el año 2012 durante la temporada de lactancia al sitio de menor altitud (Cueva Chicomostoc, Zacapoaxtla, Puebla, 1420 msnm) al inicio de la lactancia (mayo) al final de la lactancia (finales de julio) y durante la involución (agosto). De manera que se obtuvieran tejidos representativos de tres etapas del desarrollo de la glándula mamaria:

- a) Lactancia
- b) Involución
- c) Reposo

Se capturaron 4 hembras adultas por etapa. Se registró la condición reproductiva de todas las hembras capturadas, así como la masa corporal y la longitud del

antebrazo como referencia. El criterio de edad fue considerado de acuerdo a (Kunz et al., 1982; Anthony, 1988; León Galván et al., 2005).

Los murciélagos fueron capturados durante la tarde-noche mediante redes arpa montadas en la entrada principal de la cueva (figura 8). Las trampas fueron revisadas cada 15 minutos durante dos horas usando luz roja (Wilson et al., 1996). Los ejemplares capturados fueron sexados y los individuos restantes fueron liberados inmediatamente, las hembras seleccionadas fueron depositadas en bolsas de tela individualmente y transportadas a un laboratorio cercano a la cueva para su procesamiento esa misma noche.

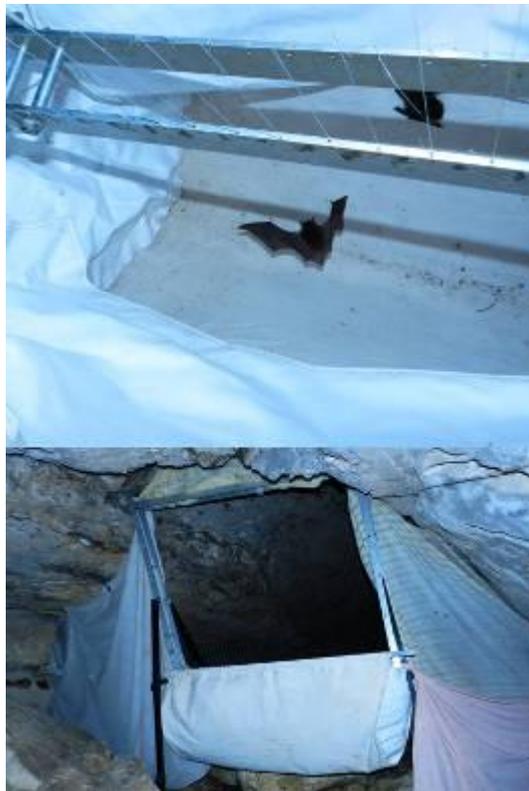


Figura 8. Captura de individuos mediante trampas tipo arpa.

De cada murciélago capturado en campo se observó y registró la apariencia externa de la glándula mamaria, con lo que se generó una clasificación arbitraria con las siguientes clases: (i) inconspicua, (ii) pequeña, (iii) mediana y (iiii) grande (Figura 9); también se consideraron aspectos que permitan asignar un estatus reproductivo al individuo (a) inactivo reproductivamente, (b) gestante, (c) lactante, y (d) post-lactante, de acuerdo a si presentaba evidencia de presencia de embrión por palpación, coloración y consistencia del pezón, cantidad de pelaje alrededor del pezón, y la cantidad (a simple vista) de material glandular.

Los animales fueron sacrificados de acuerdo a los lineamientos de la Sociedad Americana de Mastozoólogos (Sikes et al., 2011). Los individuos fueron anestesiados con éter e inmediatamente decapitados. Ambas glándulas mamarias fueron disecadas, pesadas en una balanza Mettler modelo AB204 (± 0.01 mg) y congeladas en nitrógeno líquido (-170 °C) hasta su uso posterior.

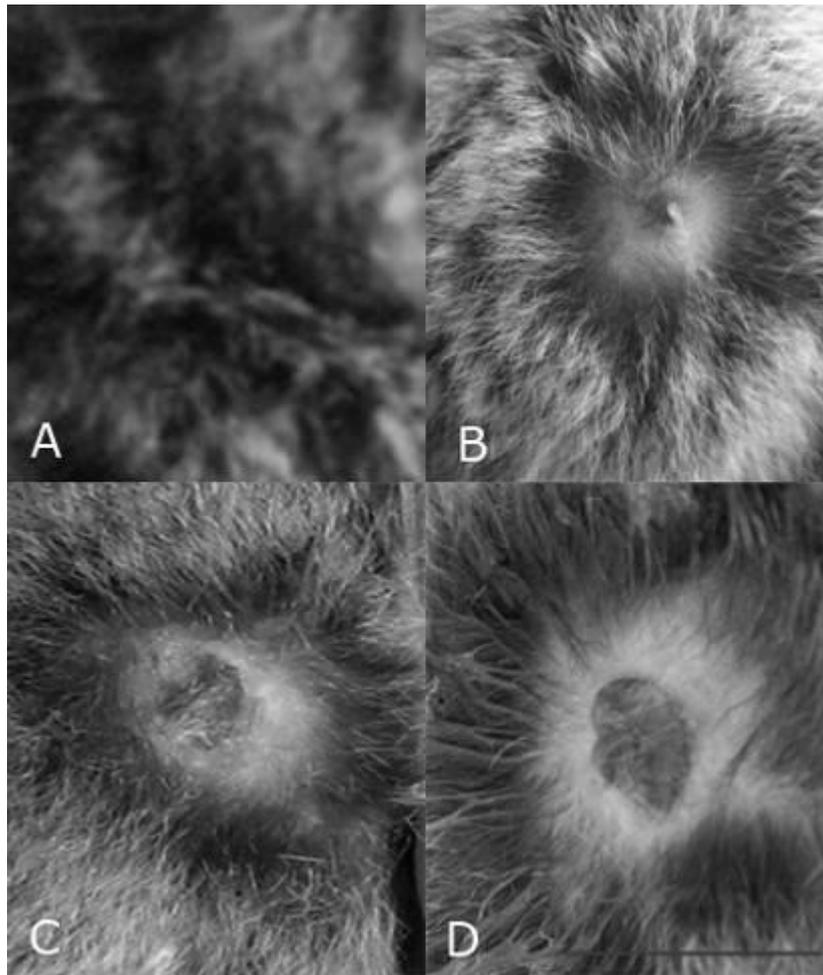


Figura 9. Fotografías obtenidas en campo de diferentes estados de desarrollo la glándula mamaria. (A) inconspicua, (B) pequeña, (C) mediana y (D) grande. Escala: 1 cm

Revisión de datos

Con el fin de llevar a cabo un análisis de varios aspectos relevantes de la lactancia de *M. velifer*, se realizó una revisión de datos preexistentes registrados durante el año 2009 de individuos estudiados mediante captura-recaptura en las tres localidades, datos que fueron obtenidos durante el desarrollo de un programa más amplio de muestreo de la especie por parte del grupo de investigadores del laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos de la UAM-I, cuyo responsable

es el Dr. Ricardo López Wilchis. Se utilizó un número de ejemplares capturados (*n*) superior a siete, para cada uno de los meses a lo largo del año.

Se recopilaron los datos de la masa corporal de las hembras adultas pertenecientes al año 2009. Se calculó el promedio mensual de masa corporal para cada mes y se realizó una prueba de ANDEVA (valor de significancia establecido a $P < 0.05$) seguido por la prueba de Tukey mediante el software Prism 6.0, con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas en su masa corporal en los distintos meses.

Para la asignación de la condición de la glándula y el pezón se tomaron en cuenta las siguientes categorías arbitrarias registradas en campo: Para la condición de la glándula mamaria: lactante (i), postlactante (ii) y no lactante (iii), y para la condición del pezón: mama inconspicua (i), mama pequeña (ii), mama mediana (iii) y mama grande (iv). Cabe mencionar que aunque la clasificación anterior es subjetiva, fue considerado de utilidad para relacionar lo observado en campo con las características a nivel histológico de la glándula.

Trabajo de laboratorio

Descripción macroscópica e histológica básica

Para realizar las descripciones macroscópica e histológica básica, se trabajó con material preexistente (2009), fijado en formol, de diferentes etapas del ciclo anual

(Tabla 1). Se utilizaron 20 glándulas mamarias en total, una glándula por cada murciélago en estudio.

Refugio	Mes de captura	Número de glándulas utilizadas (1/murciélago)	Estadio del ciclo reproductivo
El Túnel	enero	2	Reposo
El Túnel	febrero	1	Reposo
Chicomostoc	marzo	2	Reposo/ Gestación
Chicomostoc	abril	2	Gestación/ Lactancia
Chicomostoc	mayo	3	Lactancia
Chicomostoc	junio	2	Lactancia
Chicomostoc	julio	2	Lactancia/ Involución
Chicomostoc	agosto	2	Involución
La Hacienda	Septiembre	1	Reposo
El Túnel	Octubre	1	Reposo
El Túnel	Diciembre	2	Reposo

Tabla 1. Material utilizado para realizar la descripción histológica y macroscópica de la glándula, proveniente de hembras adultas capturadas durante el año 2009.

Se registraron las características macroscópicas y medidas del diámetro total y diámetro del pezón para cada una de las glándulas mamarias almacenadas; debido a que las mediciones se realizaron solamente para algunas de las glándulas, se decidió agrupar los datos para contar con un tamaño de muestra ($n=4$) que permitiera realizar un análisis estadístico comparativo, considerando las siguientes etapas del ciclo anual, en referencia al ciclo de la glándula mamaria: diciembre-enero (reposo), marzo-abril (gestación), mayo-julio (lactancia), y agosto-septiembre (involución).

Se realizaron cortes transversales a un grosor de 8 μm en un microtomo de rotación el cual se encuentra al interior de una cámara de congelación (criostato) a -20°C . Las secciones histológicas fueron teñidas mediante la técnica de hematoxilina-eosina (Presnell et al., 1997) (Anexo II), montadas con Entellan y observadas mediante microscopía de luz transmitida en campo claro. Se obtuvieron imágenes mediante una cámara acoplada al microscopio (Leica).

Se analizaron características histológicas, como el tamaño de los alvéolos y conductos galactóforos, el grado de vascularización y la presencia de productos de secreción en todas las glándulas enlistadas en la Tabla 1. Se realizó una descripción histológica comparativa de la glándula entre las diferentes etapas del ciclo, tomando en cuenta los estados fisiológicos descritos anteriormente (lactancia, involución, reposo).

Inmunohistoquímica

Para la detección de Serotonina (5-HT) en el tejido mamario, se seleccionaron cuatro glándulas mamarias representativas de las tres etapas seleccionadas del ciclo anual y se sometieron a inmunohistoquímica mediante fluorescencia indirecta. Se detectó la presencia de Serotonina (5-HT) y las enzimas TPH (Triptófano hidroxilasa) y MAO-A (Monoamino oxidasa).

Los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina, cortados en un microtomo de rotación a 12 μm de grosor y montados en laminillas con poli-l-lisina.

Se llevó a cabo la desparafinación con Xilol, Xilol/ETOH, alcohol al 100%, al 95%, al 90%, al 80%, 70%, 50%, agua destilada y PBS durante cinco minutos en cada solución.

La fijación se llevó a cabo en paraformaldehído al 4% disuelto en buffer de fosfato (PBS 0.1 M, pH 7.4).

La preparación de los tejidos se realizó de acuerdo al método previamente descrito por (Jiménez Trejo et al., 2007). Se sometieron las laminillas a una cámara de vacío durante 20 minutos con el fin de evitar la separación del tejido durante el proceso. Se realizó la postfijación con metanol-acetona 1:1 durante 30 minutos, seguida por dos lavados de cinco minutos con PBS (Jiménez Trejo et al., 2007).

La laminillas se dejaron en glicina (37.5 mg de glicina, 5 ml PBS) durante 30 minutos, y a continuación se realizaron dos lavados de cinco minutos con PBS.

Se realizó un lavado con buffer de citratos durante diez minutos y con glicina con el fin de reducir la auto fluorescencia.

Después de cinco lavados de tres minutos, se realizó el bloqueo (PBS 1%+ albúmina bovina+ Tritón) durante hora y media.

Se incubó toda la noche con anticuerpos primarios para TPH, MAO-A y 5-HT: mouse monoclonal anti 5-HT (Genetex Inc. Irvine, California, USA), rabbit anti TPH y rabbit anti MAO_A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA) 1:1200. Al día siguiente se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios: mouse monoclonal anti 5-HT (1:100, Genetex Inc. Irvine, California, USA) y alpha-rabbit anti TPH y MAO-A (1:100 Santa Cruz Biotechnology, USA) durante cuatro horas. Después de lavar, las

laminillas fueron montadas con Glicerol-PBS 1:1 y se obtuvieron fotografías con una cámara Nikon E600 acoplada al microscopio óptico. Las imágenes fueron digitalizadas y se elaboraron las figuras correspondientes mediante el software Adobe Photoshop 10.0.1 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

Doble inmunohistoquímica

Con el fin de co-localizar 5-HT, TPH y MAO-A en el tejido glandular, se llevó a cabo una inmunofluorescencia doble en los tejidos de cuatro glándulas mamarias por etapa. Se realizaron cortes en congelación a 12 μm de grosor y se montaron en laminillas con poli-L-lisina. Se llevó a cabo la fijación con metanol-acetona 1:1 y se bloqueó con albúmina bovina+ Tritón en PBS. Se dejaron incubando con el primer anticuerpo primario 1:200 toda la noche (mouse monoclonal anti 5-HT (Genetex Inc. Irvine, California, USA), rabbit anti TPH y rabbit anti MAO_A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA)). Se incubó con el anticuerpo secundario rodaminado o fluoresceinado 1:100 por dos horas: Goat anti rabbit Rhodamine, Chemicon (Millipore) AP 187R; Goat anti mouse IgG Ap 181R, (Zymed); Alexa fluor 488 Conjugated anti-actin C4 y mouse anti-cytokeratin 8 MAB3414 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) y se incubó con un segundo anticuerpo primario hasta el día siguiente. Se incubó con el segundo anticuerpo secundario por dos horas y se montó con Glicerol-PBS 1:1. Se obtuvieron fotografías con una cámara Nikon E600 acoplada al microscopio óptico.

Western blot

Con la finalidad de comprobar la presencia de las enzimas TPH y MAO-A en la glándula mamaria y comparar las diferencias de expresión entre las diferentes etapas, se procesaron tejidos en congelación de las tres etapas seleccionadas para Western blot, tres tejidos por cada etapa. Se pesó el tejido glandular y se cortó en trozos pequeños con bisturí, las muestras fueron colocadas en un tubo de ensaye con buffer de lisis (Anexo III) en una proporción 1:5 respecto al peso de las muestras.

Se disgregaron las muestras (colocadas en un recipiente con hielo) con un homogeneizador (Polytron PT 1200), exponiendo cada muestra durante 20 minutos para evitar el calentamiento.

Se dejaron reposar los tubos en hielo durante 5 minutos para disminuir la espuma, y se vaciaron las muestras en tubos Eppendorf de 1.5ml.

Se centrifugaron durante 30 minutos a 15,000 rpm. Se obtuvo el sobrenadante que contiene la proteína y se depositó en tubos nuevos de 1ml. Posteriormente, se realizó una dilución de las muestras 1:5 con RIPA

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976). Se hizo una curva de albúmina en RIPA (1mg/mol) 5TD (Tabla 2) mediante el espectrofotómetro Epoch (BioTek Instruments, Inc.) con ayuda del software Gen5.

	Bradford (1:5) (μ L)	Agua destilada (μ L)	Albúmina en RIPA (1mg/mol) (μ L)
STD1 (0)	200	10	0
STD2 (10)	200	9	1

STD3 (25)	200	7.5	2.5
STD4 (50)	200	5	5
STD5 (75)	200	2.5	7.5
STD6 (100)	200	0	10

Tabla 2. Protocolo para realización de la curva estándar de proteínas (albúmina).

Se prepararon los geles para Western blot (Anexo III) con cristales de 1.5 mm y peines de 10 carriles de 1.5 mm.



Figura 10. Gel en la cámara de electroforesis

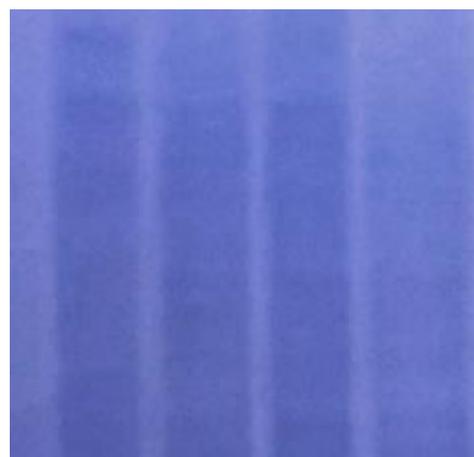


Figura 11. Gel teñido con azul de Coomassie

Una vez listos, los geles fueron montados en la cámara de electroforesis, la cual fue llenada con Buffer de corrida (Anexo III) hasta cubrir el nivel del gel (figura 10). La electroforesis fue llevada a cabo a un voltaje constante de 85V durante los primeros 25 minutos, y un voltaje de 145V durante dos horas.

Una vez terminada la electroforesis, se realizó la transferencia a 300 mA durante 1 hora 15 minutos, con membranas de 5.5 x 8.5 cm, previamente activadas con metanol absoluto. Las membranas fueron impregnadas con buffer de transferencia (Anexo III) junto con el gel.

Al finalizar la transferencia, se dejaron las membranas en suero de bloqueo (TBS tween pH 7.4 + 300 mg de BSA en 30 ml de leche al 5%) durante una hora. Se realizaron tres lavados de 3 minutos con TBS tween y se incubó con el anticuerpo primario para TPH y MAO-A: rabbit anti TPH y rabbit anti MAO_A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA), en concentración 1: 1250 todo el fin de semana.

Después de realizar cuatro lavados de 5 minutos con TBS tween se incubó con el anticuerpo secundario monoclonal goat anti-rabbit lot #E1710 de Santa Cruz Biotechnology con una concentración de 1:2000.

Después de realizar cuatro lavados de 5 minutos se procedió a revelar la membrana en acetato. El gel fue teñido con azul de Coomassie para observar las bandas de corrida de la proteína (figura 11).

Se realizó un análisis de densitometría del revelado mediante el software ImageJ 1.45.

HPLC

Se realizó HPLC (Cromatografía de alta eficacia) para detectar las concentraciones de ácido 5-hydroxindol acético (5-HIAA) y L-Triptofano (L-Trp) en cuatro condiciones diferentes: Lactancia (mayo), Involución (julio), Reposo (julio) y Reposo (Agosto). Se utilizaron los protocolos de Johansen et al, (1991) y Jiménez-Trejo et al., (2007). Las muestras de tejido fueron homogeneizadas en metabisulfito de sodio (4 mmol) en una solución de HClO₄ (0.85%) y centrifugadas a 18 000g por 16 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante el

método de Bradford. Se inyectaron las muestras en un cromatógrafo de líquidos (HPLC) marca Waters 600 con detección UV a 270nm y una columna C18/150x0.45mm en un modo de fase reversa (2000 psi, 1 mL/minuto). La fase móvil fue preparada con acetato de amonio (50mM, pH 3.50: acetonitrilo). Los picos de altura fueron medidos mediante el Software Millennium 32 (Waters Co., Milford, Mass). Los resultados están expresados en microgramos de Serotonina/L-Trp por milímetro de muestra ($\mu\text{g/mL}$ tejido).

Análisis estadístico

Para comparar las diferencias de expresión entre las distintas etapas en los resultados obtenidos mediante Western blot y HPLC, se realizó una prueba de ANDEVA (valor de significancia establecido a $P < 0.05$) seguido por la prueba de Tukey. Se confirmó que los datos cumplieran con los parámetros de homocedasticidad y normalidad previo al análisis.

Resultados

Revisión de datos anteriores para establecer el periodo de lactancia para *M. velifer* y la zona donde se lleva a cabo

En las figuras 14 y 15 puede observarse el porcentaje de individuos a los cuales se asignaron las categorías de condición de la glándula: lactante (i), post-lactante (ii) y no lactante (iii), y para la condición del pezón: mama inconspicua (i), mama pequeña (ii), mama mediana (iii) y mama grande (iv) en hembras adultas en datos

recabados durante el año 2009 por el Dr. Miguel Ángel León Galván, el Dr. Ricardo López Wilchis y colaboradores. La clasificación de la condición de la glándula (figura 12) indica que se han encontrado hembras lactantes de abril a agosto, siendo mayo el mes con mayor número de hembras lactantes. Se detectaron individuos post-lactantes de junio hasta septiembre, mientras que de septiembre a marzo la glándula no presenta indicios de actividad. La clasificación de acuerdo a la condición del pezón (figura 13), indica que las hembras presentan mama grande de abril a junio. Dicha condición predomina durante el mes de mayo, cuando un mayor número de hembras se encuentran en lactancia. Entre agosto y febrero predomina la condición de mama pequeña o inconspicua, lo cual está asociado a la inactividad de la glándula mamaria.

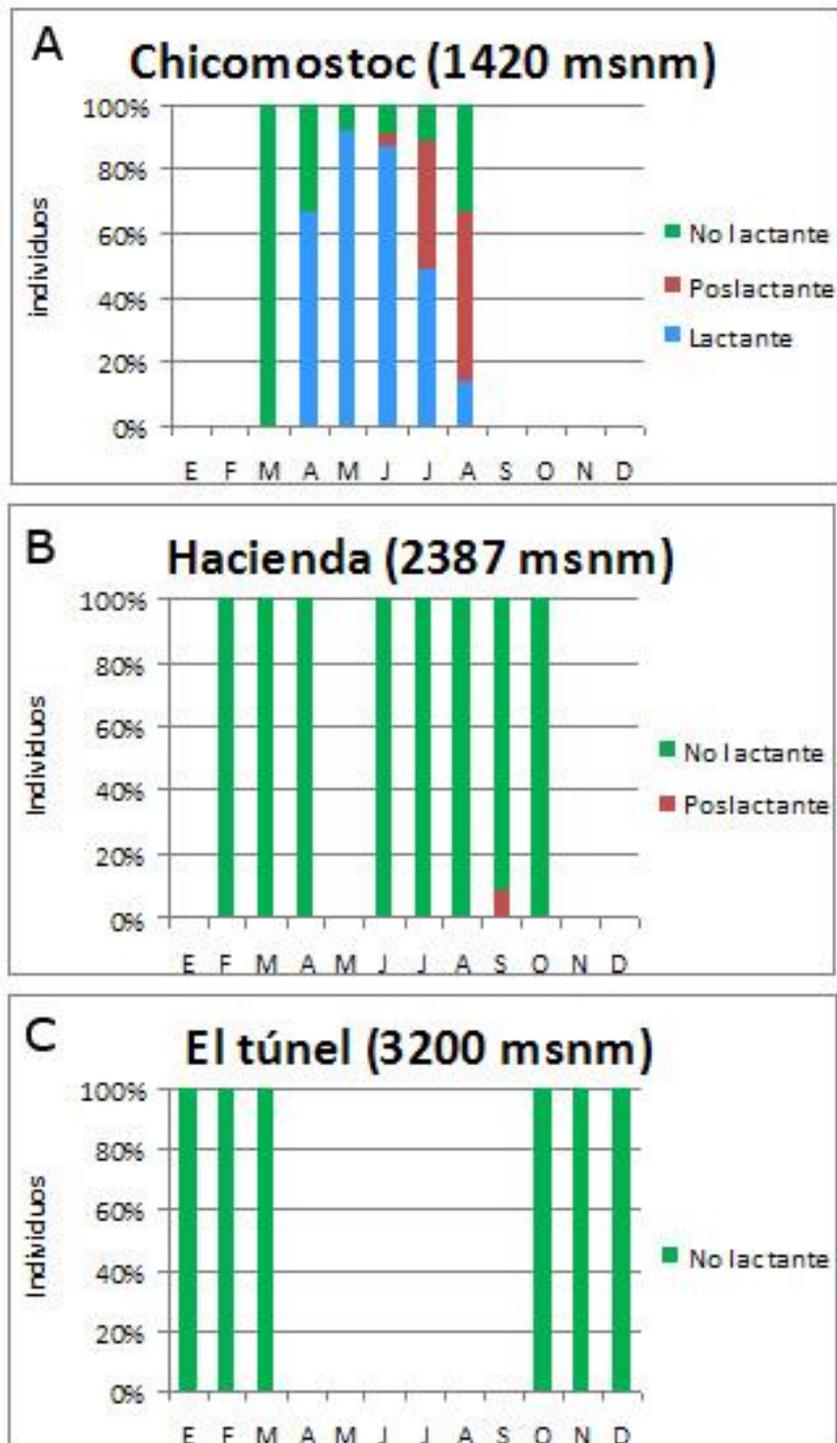


Figura 12. Condición de la glándula a lo largo del ciclo anual en hembras adultas durante el año 2009. (n<7 individuos por mes)

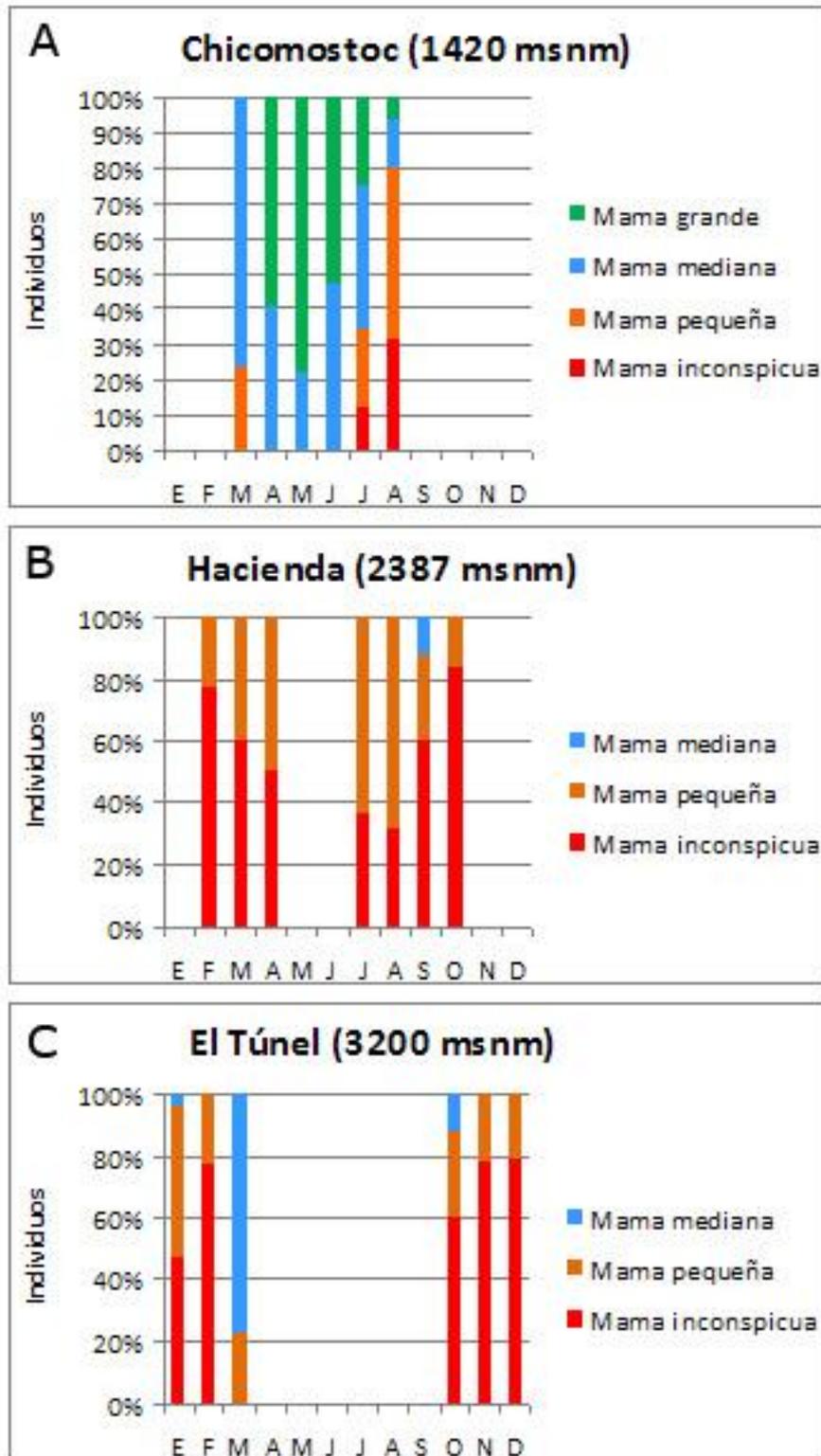


Figura 13. Condición del pezón a lo largo del ciclo anual en hembras adultas durante el año 2009 (n<7 individuos por mes)

En la figura 14 se presenta la recopilación de los datos de masa corporal de hembras adultas de *M. velifer* obtenidos durante el año 2009, donde pueden observarse las diferencias en el promedio de la masa corporal de hembras adultas a lo largo de los diferentes meses del año. Los promedios de la masa corporal fueron obtenidos a partir de al menos siete hembras por mes, encontrándose diferencias significativas de la masa corporal entre los distintos meses del año (ANDEVA $p= 0.01$, $F=12.05$), siendo el mes de abril el que presenta el valor más alto (10.3 g), y febrero el más bajo (8.76 g). Se observó disminución de la masa corporal durante el mes de agosto, al haber finalizado la lactancia.

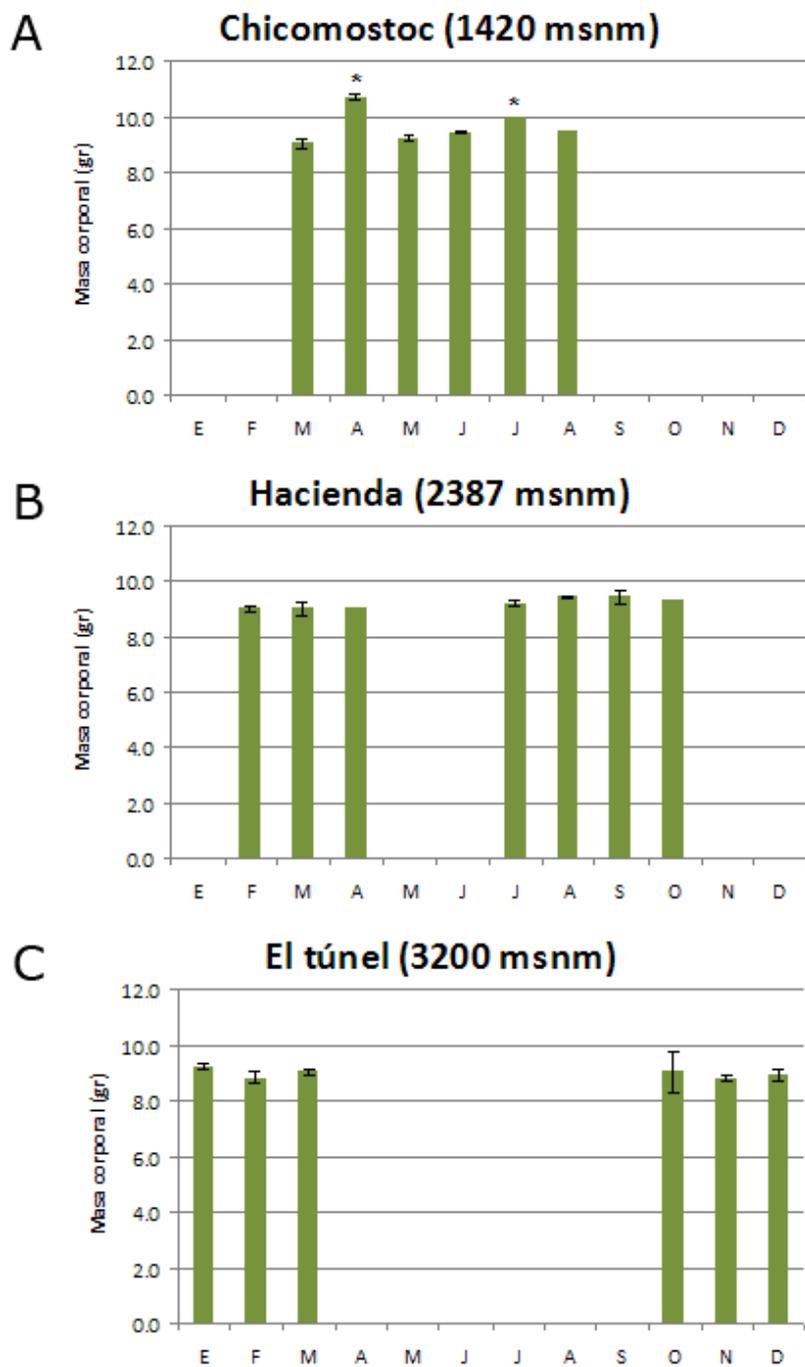


Figura 14. Variaciones en la masa corporal de hembras adultas no gestantes a lo largo del año 2009 en los diferentes sitios. Las barras representan el valor promedio mensual \pm D.S. ($n > 7$ individuos por mes) (ANDEVA $p = 0.01$, $F = 12.05$, seguida por prueba de Tukey), los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. Nótese que en algunos meses no se aprecia la barra de error, debido a su bajo valor.

Descripción macroscópica

Se encontraron variaciones significativas en el tamaño del pezón y en la glándula mamaria entre las diferentes condiciones fisiológicas (ANDEVA $p < 0.0001$, $F = 68.3$ para diámetro de la glándula, y $p < 0.0001$, $F = 76.4$ para diámetro del pezón; figura 16). En la última parte de la mamogénesis (previo al parto) y en la lactancia, la glándula mamaria alcanza su mayor grado de desarrollo. El pezón ocupa gran parte de la glándula y en ocasiones más de la mitad del área. Su aspecto es hidratado y expandido. En la lactancia tardía, el pezón adquiere una coloración oscura, y en ocasiones muestra evidencia de daño. Durante el inicio de la etapa de involución, el pezón presenta cornificación y comienza encogerse; al final de la involución el pezón presenta una apariencia blanquecina y es difícil de distinguir. Durante la fase de reposo el pezón permanece inconspicuo en la mayoría de los casos. Se observaron importantes variaciones en el tamaño del pezón y de la glándula, así como en la masa glandular a través de distintos estados fisiológicos seleccionados (figura 15).

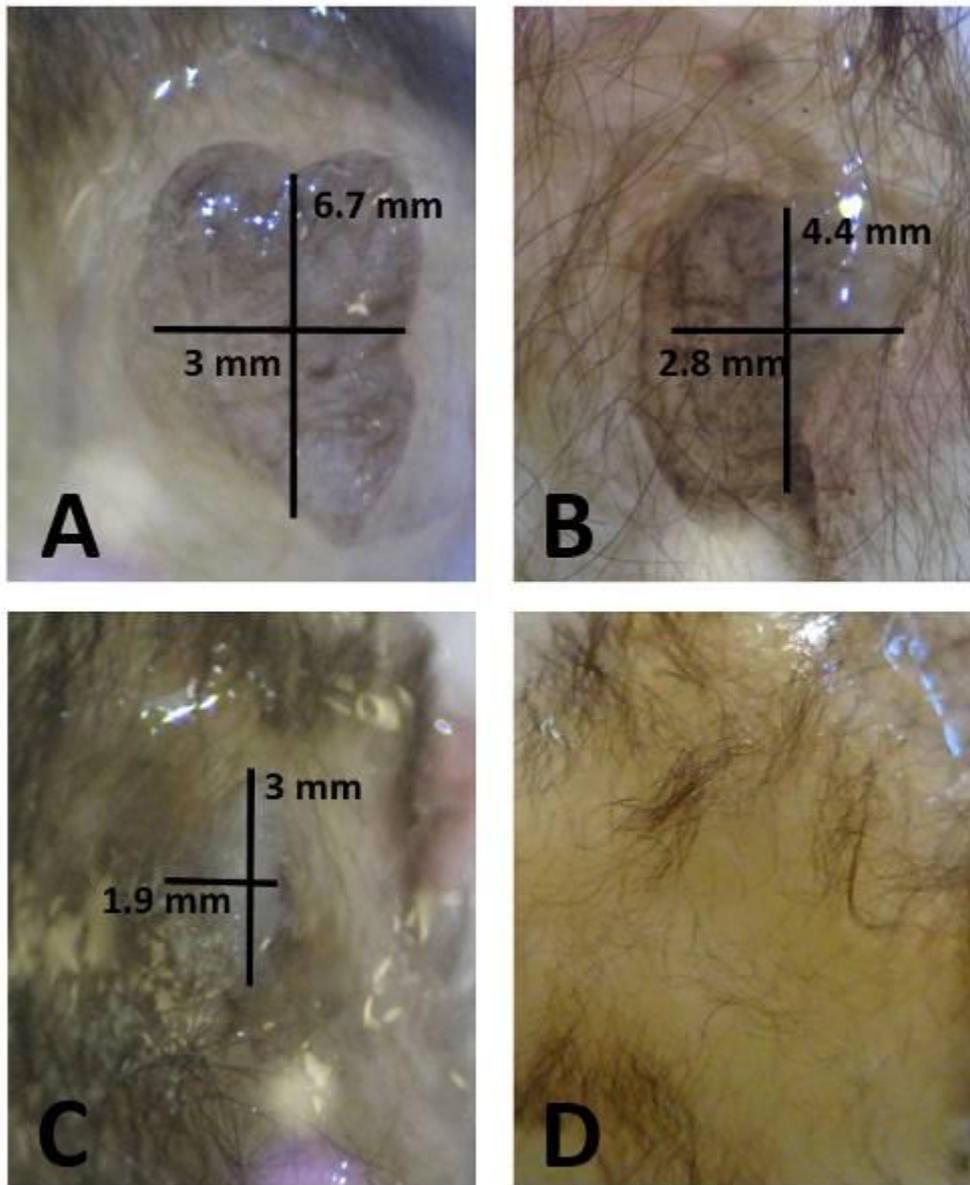


Figura 15. Apariencia externa de la glándula mamaria de hembras *M. velifer* en lactancia (A), a inicios de la involución (B), finales de la involución (C) y durante el reposo (D).

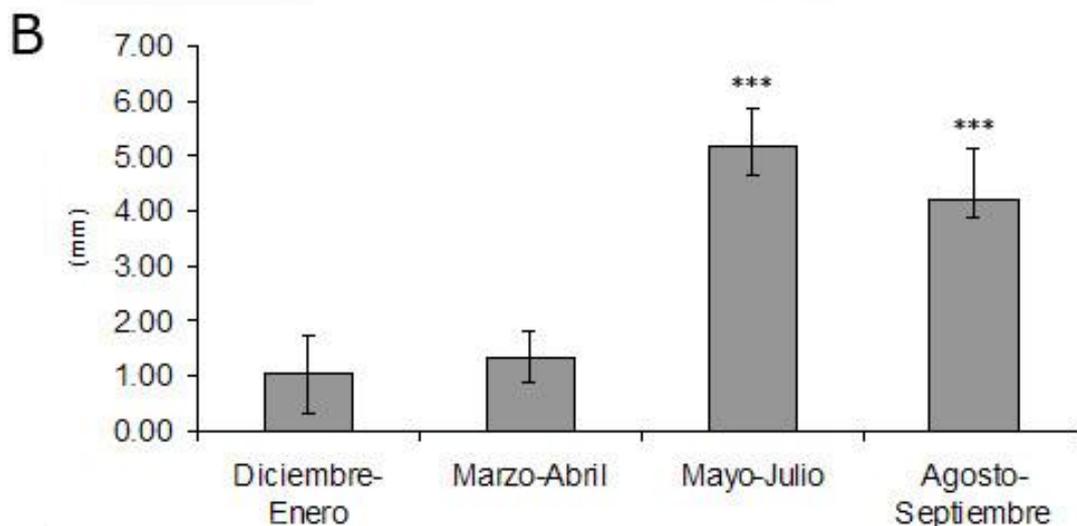
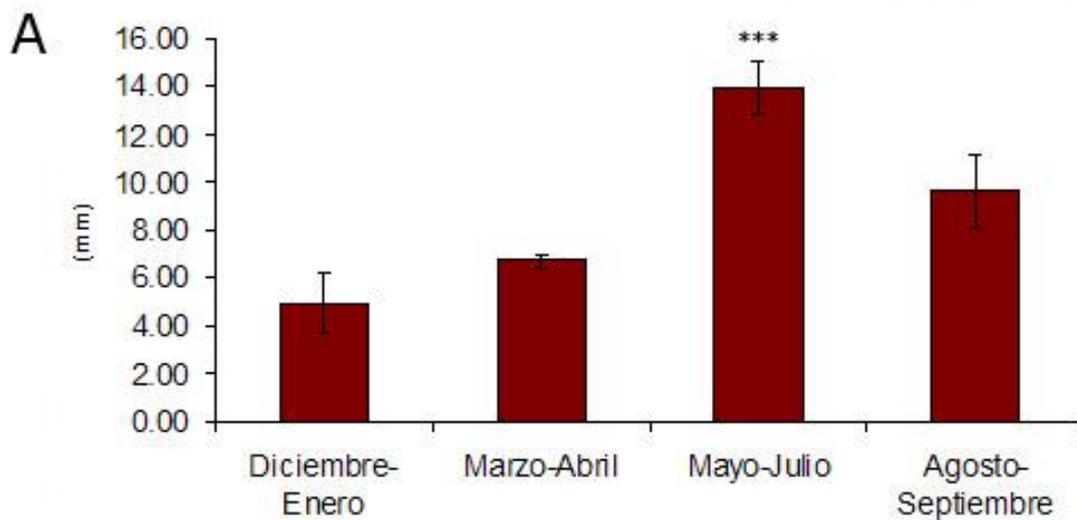


Figura 16. Variaciones en el diámetro medio de la glándula mamaria (A) y el pezón (B). Las barras representan el valor promedio \pm desviación estándar ($n=4$ glándulas) por cada etapa del ciclo anual, mismas que corresponden a diferentes condiciones de la glándula mamaria (diciembre-enero= reposo, marzo-abril=gestación, mayo-julio= lactancia, y agosto-septiembre= involución) (ANDEVA $p<0.0001$, $F=68.3$ para diámetro de la glándula y $p<0.0001$, $F= 76.4$ para diámetro del pezón, seguida por prueba de Tukey: los asteriscos indican diferencias significativas entre los valores promedio para las etapas de estudio).

Descripción histológica

La histología reveló que a lo largo del ciclo anual la glándula experimenta cambios drásticos. En la figura 17 se pueden observar los resultados de la histología de la glándula en diferentes estados fisiológicos. Al inicio de la lactancia, la mayor parte del tejido se encuentra ocupado por células epiteliales que delimitan los alvéolos, de forma redonda y con productos de secreción visibles en el lumen. Al inicio de la involución, los productos de secreción permanecen visibles en el lumen, sin embargo son menos abundantes. Se encontró que los alvéolos presentan una forma más alargada durante esta etapa, y los conductos galactóforos son más anchos y ramificados que en la lactancia. A finales de la involución, los productos de secreción son escasos, y comienza el proceso mediante el cual el estroma invade la glándula. Durante el reposo, el estroma ha invadido la glándula y los alvéolos se muestran achatados y restringidos a un área específica; este estado predomina durante todo el reposo, hasta que la glándula comienza su desarrollo cíclico después del embarazo.

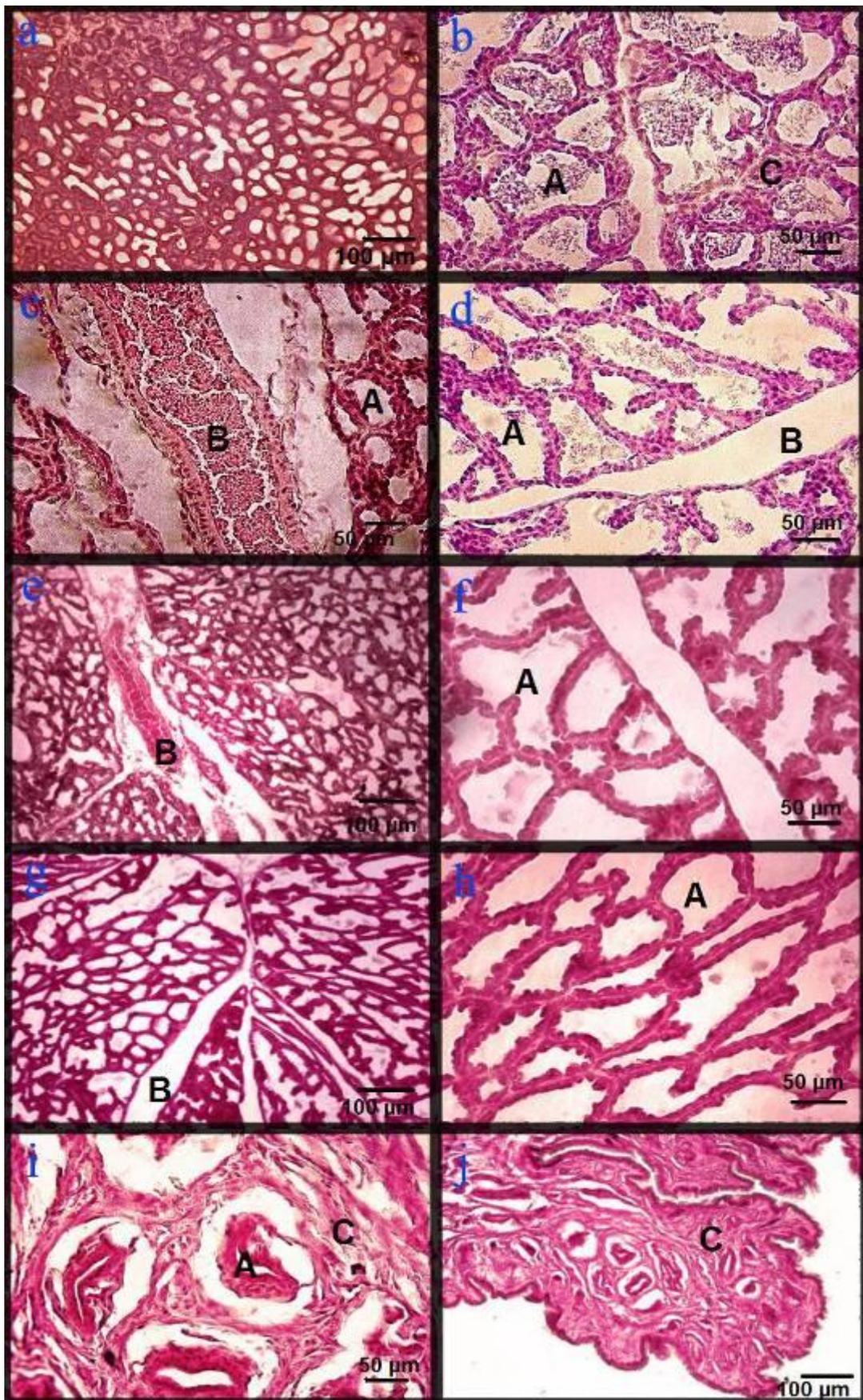


Figura 17. Histología de la glándula mamaria a lo largo del ciclo anual (tinción con H-E) en los meses de mayo (a-c), junio (d y e), julio (f-g), agosto-septiembre (h), noviembre (i) y marzo (j). A: alveolos, B: ductos galactóforos, C: Estroma interalveolar.

Inmunohistoquímica

Se observaron diferencias de expresión entre las tres etapas seleccionadas. Se observó una mayor expresión de MAO-A, TPH y 5-HT en la etapa de lactancia, mientras que la etapa de involución presentó menor marcaje para MAO-A y marcaje escaso para 5-HT y TPH. En la etapa de reposo no se observó marcaje para 5-HT y TPH, mientras que MAO-A presentó marcaje escaso y localizado (figura 18). Se detectó marcaje positivo para TPH y 5-HT, el cual fue localizado en vesículas presentes en el citoplasma de células epiteliales y mioepiteliales, así como en fibroblastos y otros elementos del estroma interlobular. El marcaje MAO-A fue ubicado en células epiteliales, y en los productos de secreción al interior del lumen alveolar; mientras que células del estroma interlobular no presentaron marcaje (figura 18).

Doble inmunohistoquímica

A través de este método se detectó una co-localización de 5-HT y TPH en células del epitelio mamario y elementos del estroma interlobular (figura 20). Se encontró que tanto las enzimas MAO-A y TPH como la 5-HT están presentes en células epiteliales luminales (figuras 20 y 21) y TPH está presente en células mioepiteliales (figura 21).

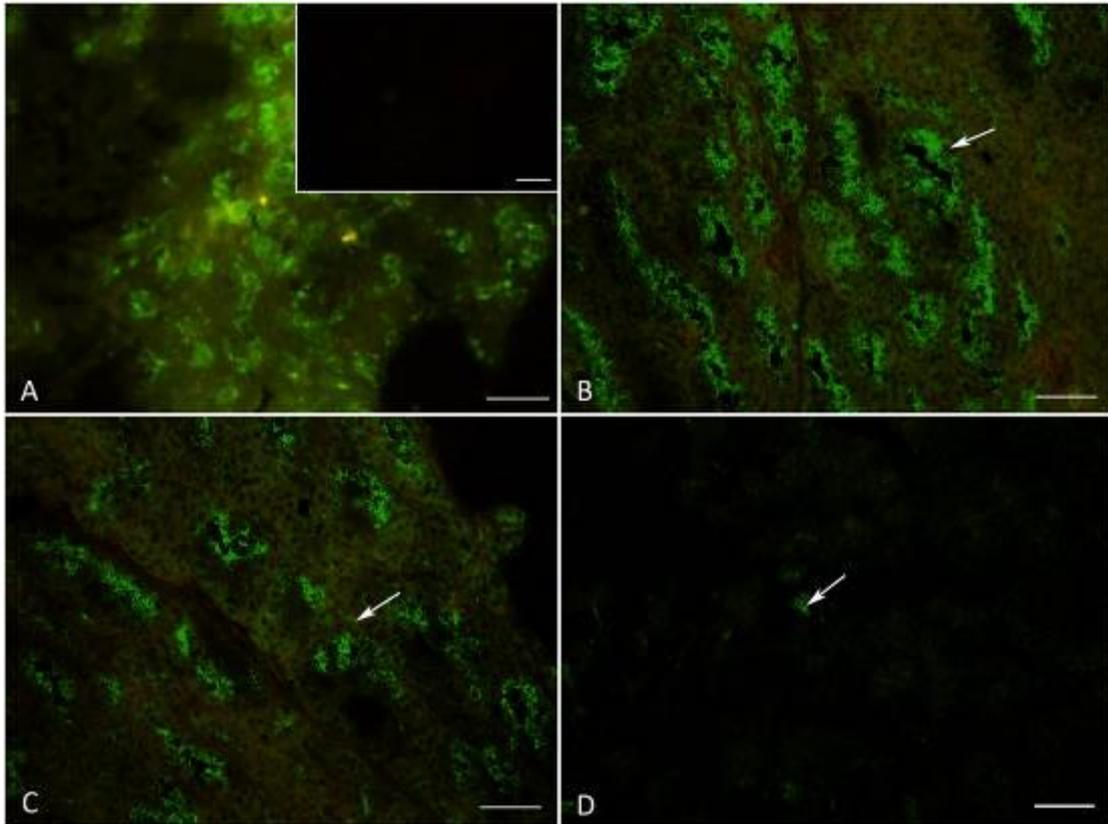


Figura 18. Fotomicrografías a 12 μm de tejidos de glándula sometidos a inmunohistoquímica para MAO-A en lactancia (B) Involución (C), y reposo (D) donde se observan diferencias de expresión entre las diferentes etapas, y se distingue la localización de MAO-A en células epiteliales y productos de secreción. Se utilizó cerebro de *M. velifer* como control positivo (A) y para el control negativo (Inserto de A) se omitió el anticuerpo primario. Escala: 100 micras.

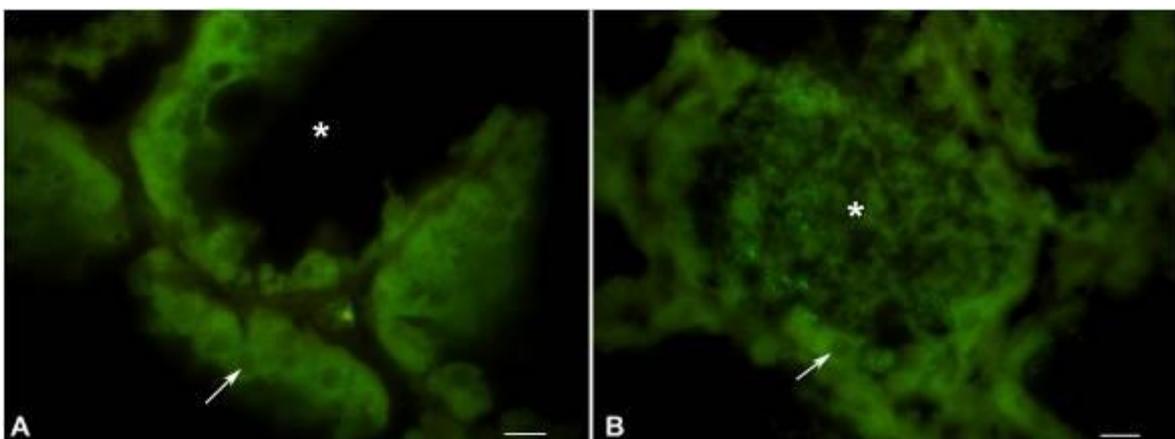


Figura 19. Fotomicrografías comparativas del inmunomarcaje para TPH (A) y MAO-A (B) durante la lactancia, donde se indican las células epiteliales (flechas) y los productos de secreción dentro del alveolo (asterisco). Escala: 20 micras.

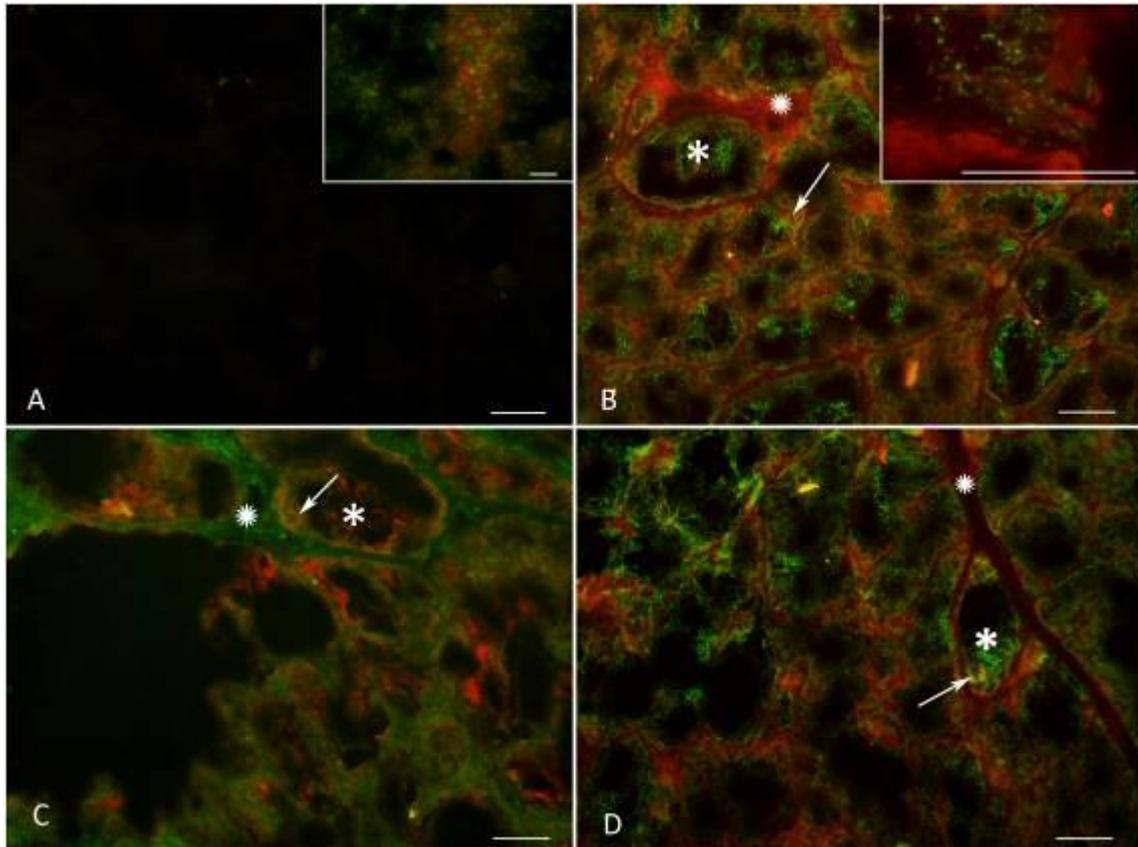


Figura 20. Fotomicrografías a 12 μm de tejidos de glándula sometidos a doble inmunohistoquímica donde se observa la localización de MAO-A, TPH y 5-HT. (A) control negativo donde se omitió el anticuerpo primario (Inserto de A) cerebro de *M. velifer* como control positivo, (B) localización de MAO-A (verde) y 5-HT (rojo) en mayo. (C) TPH (verde) y MAO-A (rojo) en lactancia y (D) MAO-A (verde) y 5-HT (rojo) en involución. Escala: 100 micras

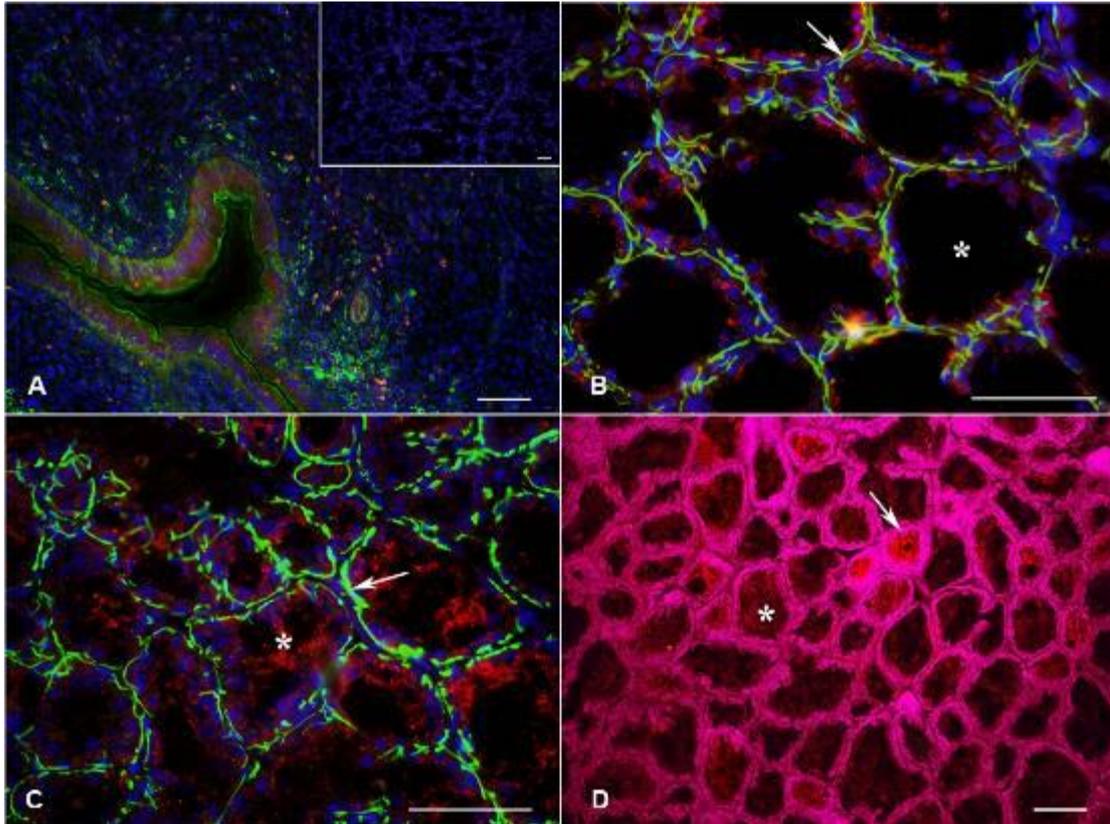


Figura 21. Fotomicrografías a 12 μm de tejidos de glándula sometidos a doble inmunohistoquímica donde se observa la localización de MAO-A y TPH en células epiteliales luminales y mioepiteliales. (A) útero de rata como control positivo, y control negativo donde se omitió el anticuerpo primario (Inserto de A) (B) TPH (rojo) y su co-localización en células mioepiteliales (amarillo, flecha) (C) TPH (rojo) y células mioepiteliales (verde, flecha) (D) MAO-A (rojo) y su co-localización células epiteliales (rosa, flecha) . Escala: 100 micras

Western blot

De acuerdo a los resultados del Western blot, se confirmó la presencia de ambas enzimas, TPH y MAO-A en la glándula mamaria, y se demostró que existen diferencias significativas de expresión a través de las diferentes condiciones fisiológicas de la glándula (lactancia, involución y reposo) (figura 23). La enzima MAO-A fue identificada como una banda con un peso molecular de 61 kDa, mientras que la banda TPH fue identificada con un peso molecular de ~51 kDa. Se utilizó β -actina como control de carga.

Para MAO-A en glándula mamaria, la expresión disminuyó progresivamente a lo largo de las tres etapas, siendo mayor en la lactancia, intermedia en la involución y menor en la etapa de reposo, respecto al control de cerebro empleado. Para TPH también se detectó una mayor presencia durante la lactancia, sin embargo, los resultados de la densitometría muestran que la expresión de TPH es mayor durante la etapa de reposo, en comparación con la involución. Los resultados de la prueba de ANDEVA denotan diferencias significativas entre las diferentes etapas ($p= 0.0005$, $F= 36.06$ para TPH y $p < 0.0001$, $F= 61.67$ para MAO-A).

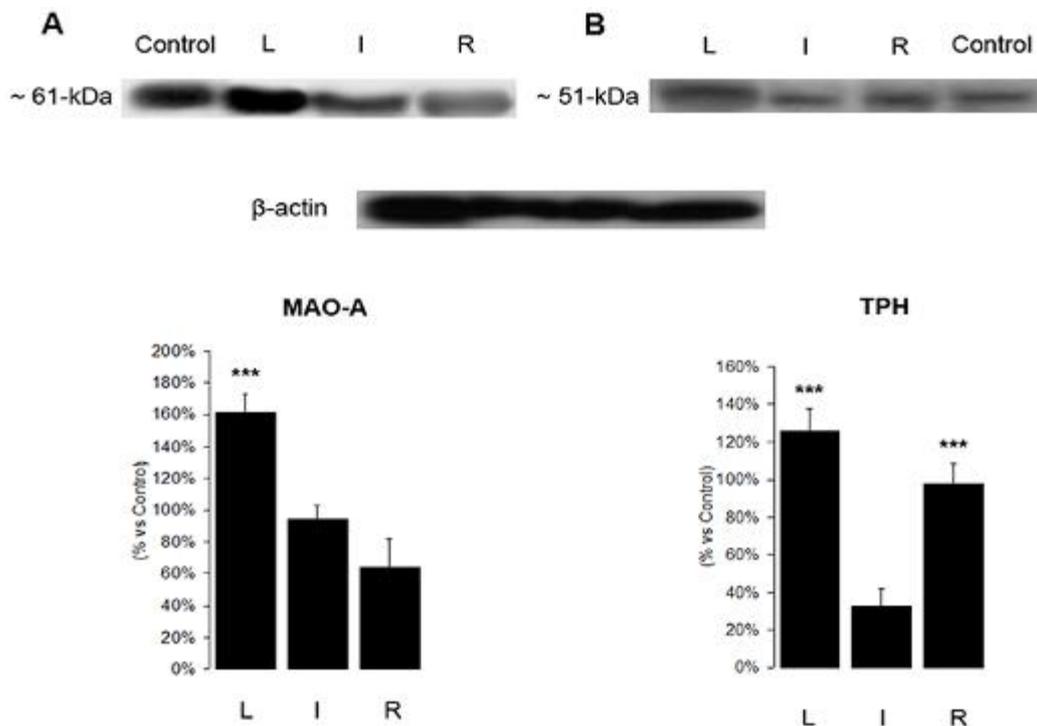


Figura 22. Blots representativos para TPH y MAO-A, donde se muestran las diferencias de expresión en las tres etapas seleccionadas del ciclo de la glándula y los resultados de la densitometría (L: lactancia, I: Involución, R: reposo). Se utilizó β -actina como control de carga, y cerebro de *M. velifer* como control para el análisis de densitometrías. Las barras representan el valor promedio \pm desviación estándar ($n=4$) (ANDEVA $p= 0.0005$, $F= 36.06$ para TPH y $p < 0.0001$, $F= 61.79$ para MAO-A, seguido por la prueba de Tukey: los asteriscos indican diferencia significativa entre grupos).

HPLC

Los resultados del HPLC mostraron abundancia tanto de L-Trp como de 5-HT durante la etapa de lactancia (figura 23). Los niveles de L-Trp durante la lactancia fueron significativamente mayores (1.33 $\mu\text{g/mL}$) al comprarlos con la involución y reposo (0.73 $\mu\text{g/mL}$ y 0.70 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), sin embargo, no mostraron diferencias significativas el ser comparados entre sí. Para 5-HT, se obtuvieron resultados similares a los del análisis por Western-blot, donde se muestra una disminución abrupta a una concentración basal de 5-HT, que es constante en la condición de reposo tanto en julio como en agosto. Los resultados de la prueba de ANDEVA denotan que la disminución en los valores para las etapas de involución y de reposo de la glándula mamaria respecto de la etapa de lactancia tanto para 5-HT como para L-Trp son estadísticamente significativos ($p < 0.0001$).

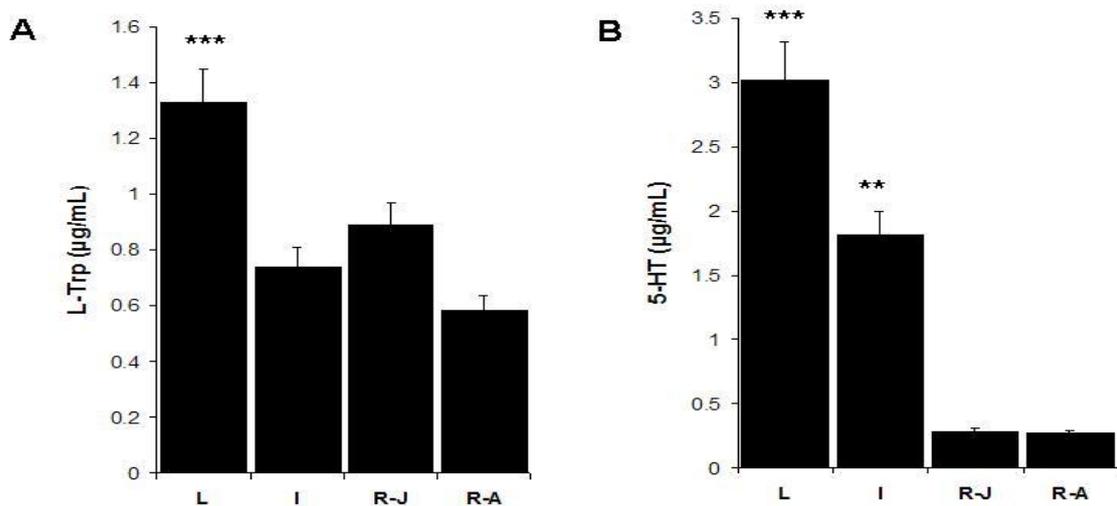


Figura 23. Análisis mediante HPLC para 5-HT y L-Trp, donde se muestran las variaciones en las concentraciones durante lactancia (L), Involución (I), reposo en el mes de julio (R-J) y reposo en el mes de agosto (R-A). Las barras representan el valor promedio \pm desviación estándar ($n=4$) (ANDEVA $p < 0.0001$, $F = 59.8$ para L-Trp y $p < 0.0001$, $F = 92.1$ para 5-HT, seguido por la prueba de Tukey: los asteriscos denotan diferencia significativa entre grupos).

Discusión

Desde hace tiempo, el grupo de investigación ha utilizado una clasificación arbitraria para determinar el grado de desarrollo de la glándula mamaria en *Myotis velifer* en campo, sin embargo, no se había confirmado su estado fisiológico histológicamente. Los cambios en la glándula mamaria del murciélago pueden ser distinguidos externamente mediante los cambios en el tamaño del pezón, grado de cornificación y apariencia externa (Heideman, 1988; Kunz et al., 1996; Crichton et al., 2000). Particularmente en diversas especies entre las que se encuentra *M. velifer* estos cambios son drásticos y nos dan una idea clara de lo que está ocurriendo al interior de la glándula.

Los datos obtenidos mediante la clasificación arbitraria de la glándula mamaria realizada en campo aportan información acerca del periodo en el cual se lleva a cabo la lactancia. El grupo de investigación del Dr. Miguel Ángel León Galván y colaboradores ha desarrollado dos clasificaciones subjetivas que permiten evaluar el estado fisiológico de la glándula mamaria: La primera evalúa la condición de la glándula y la segunda, la condición del pezón (datos no publicados). La primera clasificación incluye las categorías: lactante, poslactante y no lactante. En las hembras que presentan glándulas identificadas como lactantes, la piel se encuentra desprovista del habitual pelo que la cubre, pueden presentar productos de secreción, así como evidencias de daño visibles causadas por mordeduras por parte de la cría. Histológicamente, en esta categoría la glándula mamaria se encuentra activa, presenta productos de secreción dentro de los alvéolos y el estroma es escaso. Al igual que se ha reportado para el ratón, en la glándula mamaria de murciélago el tamaño de los ductos galactóforos aumenta a lo largo

de la lactancia, siendo más gruesos y ramificados cuando ésta ha finalizado, probablemente debido a la constante acumulación y transporte de leche a través de estos conductos (Wade, 2011). Las glándulas identificadas como poslactantes presentan evidencias de lactancia, tales como daños externos en el pezón, y una región desprovista de pelo, sin embargo su masa ha comenzado a reducirse y carecen de productos de secreción visibles, lo cual sugiere que la lactancia ha finalizado y han comenzado a involucionar; histológicamente, la glándula aún presenta productos de secreción dentro de los alvéolos, sin embargo, el estroma ha comenzado a invadir el tejido mamario. En contraste, en la categoría no lactante, la piel de la zona donde se encuentra la glándula mamaria está cubierta por pelo y la glándula no presenta indicios de lactación; histológicamente, el estroma ha invadido la glándula y los alvéolos se encuentran restringidos a un área reducida.

La segunda clasificación, respecto a la condición del pezón, también aporta información valiosa respecto al estado fisiológico de la glándula, sin embargo, al tratarse de una clasificación que depende del observador, es mucho menos precisa, además, debe tomarse en cuenta que las hembras pueden presentar diferencias en el tamaño del pezón asociadas al número de partos o la edad, que dificultan la asignación de las categorías. En dicha clasificación, la mama presenta cuatro categorías: grande, pequeña, mediana e inconspicua. Los individuos dentro de la categoría de mama grande presentan un pezón amplio y de aspecto hidratado, lo cual corresponde a la última fase del embarazo-primer fase de la lactancia. Los individuos asignados dentro de la categoría mama

mediana presentan un pezón de menor tamaño y mayor grado de cornificación, ya que la fase de involución ha iniciado. Los individuos con glándula pequeña, muestran rasgos evidentes de involución y un alto grado de cornificación del pezón. Por último, la fase de glándula inconspicua es la que predomina a lo largo del año, durante esta fase el pezón está cubierto por pelo y no es posible distinguirlo a simple vista.

De acuerdo a los datos obtenidos en 2009 del presente trabajo, y a pesar de lo reportado por Kruttsch (2009) quién indicó que en poblaciones del sur de Estados Unidos la ovulación es postergada hasta la primavera, para la población de *M. velifer* del centro de México en estudio, existe una variabilidad interindividual importante, puesto que la gestación no ocurre al mismo tiempo en todos los individuos y puede presentarse un desfase hasta de un mes entre unos y otros, sin embargo, a nivel poblacional, es posible delimitar el ciclo completo de la glándula mamaria entre marzo y septiembre, incluyendo su reactivación y completa involución.

Considerando datos de campo obtenidos por el grupo de investigación e incluyendo los datos de Arratia (2000) y los de Camacho (2002), la presencia de individuos de *M. velifer* de las tres poblaciones de estudio permite reconocer los periodos del año en los que los murciélagos se encuentran ocupando cada uno de los tres diferentes refugios, y el sitio en el que se lleva a cabo la lactancia. Las observaciones hechas en campo indican que la lactancia se lleva a cabo en la localidad más baja (Cueva Chicomostoc, 1420 msnm), aunque también se ha registrado presencia de hembras en la localidad media durante la temporada que

corresponde a la lactancia (Hacienda “La Almeya”, 2387 msnm), sin embargo, en este sitio no se han encontrado hembras lactantes, y las hembras adultas encontradas en el periodo de marzo a julio presentan una glándula mamaria inconspicua (Figura 12). De manera interesante, durante el mes de septiembre, se encontraron hembras poslactantes en la Hacienda (Figura 12), lo cual sugiere que estos individuos han arribado a este refugio probablemente de zonas más bajas en las cuales llevan a cabo la lactancia, un aspecto de la dinámica poblacional y de la movilidad que tiene la especie en la región del centro de México que requiere corroborarse mediante otros estudios diseñados para conseguir la información que lo sustente. El refugio “Cueva Chicomostoc” es abandonado por completo durante los meses más fríos (Noviembre a Febrero), tanto por los machos como por las hembras, y presenta la mayor cantidad de individuos durante primavera-verano, intervalo que corresponde a la temporada de temperatura más alta y lluvias en la región, así como de la lactancia y la gestación por parte de los individuos. Por otro lado, la localidad de mayor altitud donde se lleva a cabo la hibernación (refugio “El túnel”, 3220 msnm) presenta la mayor cantidad de individuos durante los meses más fríos, mientras que permanece despoblada durante los meses más calurosos.

Cabe mencionar que en el mes de abril el embarazo ya se encuentra avanzado, pero aún no ha llegado a término en la mayoría de los individuos y parte del aumento en masa seguramente se debe al feto que se encuentra en la etapa final de su desarrollo. En la transición de embarazo a lactancia, se reporta que las hembras de *M. velifer* aumentan el consumo de alimento en un 45% (Anthony et al., 1977), lo cual concuerda con el aumento significativo en la masa corporal de

M. velifer en el mes de abril para la población de estudio, ya que dicha masa corporal extra, podría estar destinada a proveer la energía necesaria para llevar a cabo la lactancia que es el proceso fisiológico más demandante. En el mes de mayo, cuando han ocurrido la mayoría de los partos y la lactancia ha iniciado, la masa corporal presenta una disminución. De manera interesante, a lo largo de la lactancia la masa corporal de las hembras aumenta progresivamente, lo cual sugiere que una mayor cantidad de grasa es almacenada no sólo para mantener esta costosa función (Anthony et al., 1977), sino también probablemente, para aportar energía que sustente un desplazamiento a otros refugios cuando la lactancia ha finalizado. A partir del mes de agosto existe una tendencia a la disminución de la masa corporal, lo cual puede deberse tanto al gasto energético invertido en los desplazamientos, como al hecho de que haya finalizado la etapa de lactancia y se hayan destinado las reservas energéticas a la misma. La masa corporal de las hembras adultas es mantenida durante el periodo de hibernación, temporada en la cual si se requiere de reservas energéticas pero estas se mantienen en cierta medida gracias a la disminución del metabolismo precisamente por el aletargamiento fisiológico que implica la hibernación.

Krutzsch (2009) reportó que el ciclo reproductivo de *M. velifer* para algunas poblaciones del norte se caracteriza por un proestro y cópula otoñal, seguidos por un periodo de hibernación y estro mantenido, y posteriormente por una ovulación primaveral y fertilización. De acuerdo a los datos aportados en el presente estudio, el ciclo de la glándula mamaria de las poblaciones del Centro de México analizadas, concuerda con lo reportado para aquellas que habitan en el sur de los

Estados Unidos, donde se encontraron hembras en lactancia de mediados del mes de mayo a mediados de julio, sin embargo, existe una ligera variación temporal ya que en el centro de México, se han encontrado hembras lactantes desde la primera semana de mayo, hasta la primera semana de agosto, con una duración aproximada de 60 días a nivel individual. Estas variaciones pueden deberse a varios factores, tales como las diferentes condiciones climáticas asociadas a variaciones geográficas (Krutzsch, 2009).

De mediados de septiembre a marzo, la glándula se encuentra en reposo y no presenta evidencia de actividad alguna. El ciclo de la glándula depende directamente del patrón reproductivo asincrónico de la especie, en el cual, la ovulación es postergada (Krutzsch, 2009), por lo tanto, podríamos decir que ocurre un desarrollo postergado de la glándula mamaria asociado a este fenómeno. Tras las cópulas que ocurren en otoño, las hembras entran en un receso reproductivo debido a la hibernación y mantienen almacenado el esperma; al término de este fenómeno la actividad reproductiva es reiniciada y ocurre la fertilización dando inicio a la gestación; este es el punto en el cual la glándula comienza su desarrollo; dicho desarrollo finalizará poco antes del parto y el estado fisiológico de la glándula será mantenido a lo largo de la lactancia (Richert et al., 2000). Al finalizar la lactancia, tendrá lugar el proceso de involución, que implicará una drástica remodelación glandular a nivel histológico. El proceso de involución finalizará en el mes de septiembre, cuando la glándula mamaria alcanza el estado de reposo, y permanece de esta forma hasta que ocurran cambios hormonales asociados al embarazo y al parto (Henninghausen et al., 1997; Martinet et al., 1999).

La importancia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, consiste en el hecho de que se aporta información histológica que permite asignar con mayor precisión el estado de la glándula mamaria mediante observación externa y comparándolo con los datos histológicos registrados, lo cual, evitará el sacrificio de animales para este fin y contar con una mejor designación del estatus reproductivo de hembras para fines de investigación directamente en campo.

Estudios recientes demuestran que la 5-HT juega un papel importante en la homeostasis de volumen intraluminal de varios órganos, incluyendo la glándula mamaria (Vaibhav et al., 2011). En la glándula mamaria, la 5-HT actúa a través del receptor 5-HT₇, inhibiendo la síntesis de leche y promoviendo el inicio del proceso de involución (Vaibhav et al., 2008; 2011). El mecanismo de acción para la 5-HT en glándula mamaria ha sido descrito previamente en ratón, humano y bovino. La 5-HT promueve indirectamente la apertura de las uniones estrechas en células epiteliales (Marshall et al., 2010; Vaibhav et al., 2011). A baja concentración, la 5-HT incrementa la resistencia transmembranal de estas células, y cuando la concentración es más altas y la exposición más prolongada, la 5-HT disminuye la resistencia transepitelial y causa la disrupción de las uniones estrechas (Matsuda et al., 2004; Vaibhav et al., 2008; 2011; Marshall et al., 2010). Además, se ha reportado que la 5-HT no sólo es un importante regulador de los espacios alveolares y del volumen de leche, sino que además regula procesos como el desprendimiento de las células y la apoptosis (Vaibhav et al., 2011). En este estudio se muestra por primera vez la expresión, localización y concentración de 5-HT en la glándula mamaria de una especie de murciélago,

particularmente en este caso, de *M. velifer*. Al igual que lo reportado en roedores, la acción de la 5-HT en la glándula mamaria del murciélago es controlada intracelularmente a través de un balance entre síntesis y degradación, dado por las enzimas MAO-A y TPH (figura 24). Mientras que la MAO-A lleva a cabo la desaminación oxidativa inactivando el exceso de 5-HT, la TPH es la enzima responsable de la biosíntesis de 5-HT (Marshall et al., 2010).

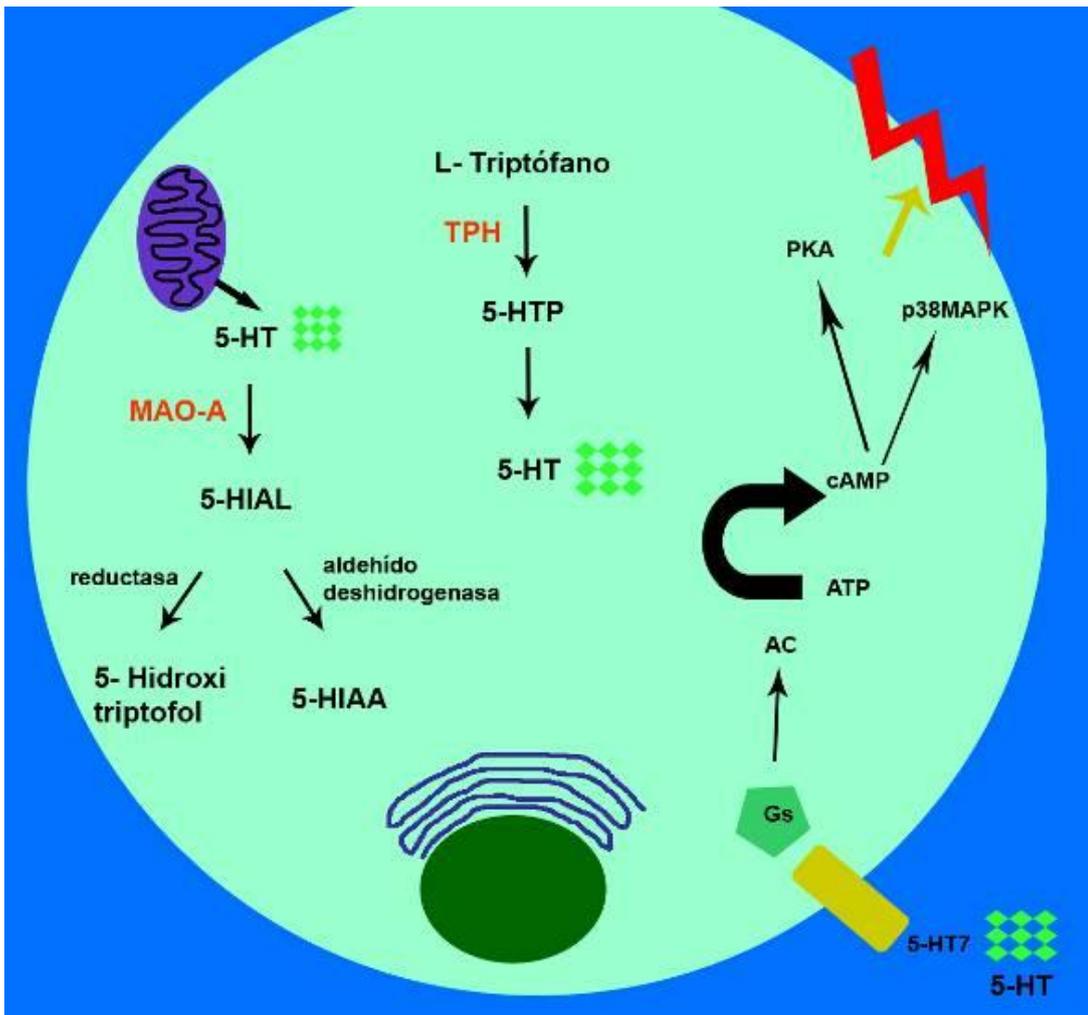


Figura 24. Propuesta de sistema epitelial de 5-HT en glándula mamaria de murciélago. Donde se esquematiza de izquierda a derecha, la degradación, la síntesis y el mecanismo de acción de la 5-HT sobre las uniones estrechas. (5-HTP: 5 hidroxitriptofano ,5-HIAL: 5-hidroxindol-3-acetaldehído, 5-HIAA: ácido 5-hidroxindolacético, cAMP: Adenosín monofosfato cíclico, Gs: proteína Gs, Ac: adenilato ciclasa, ATP: adenosin trifosfato, p38MAPK: quinasa activada por mitógenos, PKA: proteína quinasa A). Información consultada y adaptada a partir de los trabajos de: Bortolato et al., 2010; Marshall et al., 2010; Vaibhav et al., 2011.

En la glándula mamaria del murciélago *M. velifer*, se registró una mayor concentración de 5-HT, TPH, MAO-A y L-Trp (precursor de 5-HT) durante la lactancia. Los niveles de MAO-A y TPH disminuyen durante la involución, alcanzando su nivel más bajo durante el reposo. Lo anterior sugiere que la alta concentración de 5-HT es requerida durante la lactancia para fortalecer las uniones estrechas y causar su disrupción como consecuencia (Vaibhav et al., 2008). Sin embargo, cuando el proceso de involución inicia, la concentración de 5-HT disminuye alcanzando un nivel basal que es mantenido durante el reposo.

De manera interesante, se encontró que las enzimas TPH y MAO-A en la glándula mamaria de murciélago difieren en su distribución, si bien se ha reportado la presencia y función de la 5-HT en células epiteliales (Vaibhav et al., 2011), su función en otros tipos celulares presentes en la glándula mamaria es desconocida. En el murciélago, además de en células epiteliales, se encontró TPH en células mioepiteliales y células del estroma, por su parte, MAO-A está presente en las células epiteliales y en los productos de secreción, pero se encuentra ausente en el estroma interlobular. Se ha reportado previamente que MAO-A puede estar presente en fibroblastos del estroma (Bissel et al., 2002; Holschneider et al., 2000), sin embargo, no se había reportado hasta ahora la presencia de TPH en células estromales; por lo anterior, se sugiere que en el murciélago la 5-HT podría estar siendo sintetizada en células del estroma y actuando de manera parácrina en células epiteliales, o bien, realizando una función asociada al drástico remodelamiento tisular que ocurre durante el ciclo de la glándula mamaria. Además de participar en la degradación de 5-HT, MAO-A podría participar en otros procesos, tales como la muerte celular por apoptosis, la

cual es iniciada en la mitocondria (Naoi et al., 2006), y para el caso del murciélago, debe tener participación en la regresión ordenada de la glándula durante la fase de involución, un aspecto que requiere probarse mediante estudios diseñados específicamente para ello. Otro aspecto que resulta interesante, es el hecho de haber encontrado MAO-A en los productos de secreción, ya que el consumo de MAO-A en la dieta se ha ligado con modificaciones en la conducta en mamíferos (Mejía et al., 2002). De esta forma, el suministro de MAO-A durante la lactancia podría modificar la conducta de las crías, principalmente aumentando su agresividad. Este aspecto permite visualizar perspectivas para estudios relacionados con la conducta de las crías, particularmente en especies de murciélagos que forman colonias de maternidad en las que las crías son agrupadas en guarderías y seguramente existe una fuerte competencia al momento del arribo de las madres para lograr alimentarse.

Se han detectado diversos receptores de 5-HT en glándula mamaria, entre los cuales se encuentran 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{3A} y 5-HT₇ (Vaibhav et al., 2011; Collier et al., 2012). Sin embargo, 5-HT₇ ha sido el único receptor reportado para todos los grupos en las que se ha estudiado el mecanismo de acción de la 5-HT en la glándula mamaria: bovinos, humanos y ratones. Es por tanto muy probable que los murciélagos presenten este receptor en células epiteliales de la glándula mamaria, y podrían presentar otros receptores en común con el humano. El receptor 5-HT₇ también conserva su posición entre los distintos grupos, ya que se encuentra ubicado en posición baso-lateral de las células epiteliales (Vaibhav et al., 2011). El transportador SERT, también se encuentra presente tanto en

roedores como en humanos y es probable que se conserve dentro del grupo de los mamíferos. A diferencia del receptor, su posición es apical (Marshall et al., 2010).

Los resultados sugieren que la 5-HT juega un papel similar en la glándula mamaria de murciélago, respecto a lo que se ha reportado para otras especies, como los roedores y los bovinos. Lo cual apoya la propuesta de que la participación de la 5-HT como regulador local de la homeostasis de volumen intraluminal podría ser un proceso conservado entre los mamíferos como grupo (Vaibhav et al., 2011).

El efecto de la 5-HT sobre la glándula mamaria es complejo y queda mucho por dilucidar al respecto, ya que podría llevar a cabo otras funciones en dicho órgano. Estudios recientes sugieren que la 5-HT podría incluso estar participando en el metabolismo energético durante la transición de embarazo a lactancia, afectando la expresión de los transportadores de glucosa mamaria, que cumplen la función de nutrir al feto y son precursores de la síntesis de lactosa (Laporta et al., 2013). Sin embargo, poco se sabe respecto a la forma en la que se lleva a cabo éste y otros mecanismos en la glándula mamaria, y es por eso que se requieren más estudios para tener un panorama más amplio de los efectos de la 5-HT durante el complejo proceso de la lactancia.

Conclusiones

- El ciclo de la glándula mamaria en *M. velifer* inicia en el mes de marzo, con la gestación y finaliza en septiembre, cuando la glándula ha involucionado por completo.
- Para las tres poblaciones de estudio de *M. velifer* en el centro de México, la lactancia se lleva a cabo en el sitio de menor altitud (Cueva Chicomostoc, 1420 msnm) y abarca de inicio de mayo a finales de julio.
- La masa corporal promedio de hembras no gestantes de *M. velifer* fue mayor durante el mes de mayo, mes que corresponde al inicio de la lactancia.
- La clasificación arbitraria fundamentada en características morfológicas externas de la glándula mamaria como: lactante, poslactante e inconspicua, se encuentra relacionada con los estados fisiológicos: lactancia, involución y reposo respectivamente, lo cual ha sido corroborado histológicamente.
- Existe una expresión diferencial de 5-HT y ambos componentes del sistema serotoninérgico, TPH y MAO-A a lo largo del ciclo de la glándula mamaria, siendo mayor su expresión durante la etapa de lactancia.
- La 5-HT, MAO-A y TPH alcanzan un nivel basal que es mantenido durante la etapa de reposo, después de haber realizado su respectiva función durante la lactancia e involución de la glándula.

- Existe co-localización de TPH y 5-HT, ya que están presentes en el citoplasma de las células epiteliales y mioepiteliales, así como en el estroma interlobular de la glándula mamaria.
- La enzima MAO-A está presente en células epiteliales y productos de secreción al interior del lumen alveolar.

Bibliografía

Adams R., Pedersen S.C. (2000). Ontogeny, functional ecology, and evolution of bats. Cambridge University Press. 410 p.

Adams J., Watt F. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117: 1183–1198.

Alerstam T., Hedenström A., Åkesson S. (2003) Long-distance migration: evolution and determinants. *Oikos* 103: 253

Allen H. (1880) Mammary glands of bats. *Proc Acad Nat Sci Philad* 32: 133.

Anthony E. L. P. (1988) Age determination in bats. En: *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Smithsonian Institution Press. 533 p.

Anthony E. L. P., Kunz T. (1977) Feeding strategies of the little brown bat *Myotis lucifugus* in Southern New Hampshire. *Ecology* 58: 775-786.

Arratia G.S. (2000) Algunos aspectos básicos de la biología de *Myotis velifer* (Chiroptera: Vespertilionidae) durante un ciclo anual en los estados de Puebla y Tlaxcala. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. 86 p.

Asch H., Asch B. (1985). Expression of keratins and other cytoskeletal proteins in the mouse mammary epithelium during the normal developmental cycle and primary culture. *Dev Biol* 107: 470–482.

Baage H. (1977) Age determination in bats (Chiroptera). *Videnskabelige Meddelelser fra Danske Naturhhostorisk Forehing* 140: 53-93.

Baer B., Armitage S., Boomsma J. (2006) Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* 441: 872-875.

Balmori A. (1999) La reproducción de los Quirópteros. *Revisiones en mastozoología* 11: 31, 33.

Barcellos-Hoff M., Aggeler J., Bissell M. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 105: 223–235.

Barclay R.M.R., Harder L.D. (2003) Life histories of bats: life in the slow lane. *Bat Ecology*. University of Chicago Press, Chicago. 256 p.

Bequette B., Kyle E., Crompton L., Buchan V., Hanigan M. (2001) Insulin Regulates Milk Production and Mammary Gland and Hind-Leg Amino Acid Fluxes and Blood Flow in lactating goats. *J Dairy Sci* 84: 241–255.

Berger M., Gray J., Roth B. (2009) The expanded Biology of Serotonin. *Annu Rev Med* 60: 355-360.

Bishop C., Jones G., Lazarus C., Racey P. (1992) Discriminate suckling in pipistrelle bats is supported by DNA fingerprinting. *Molecular Ecology* 192: 255-258.

Bissel P., Bigley M., Castagnoli K., Castagnoli N. (2002) Synthesis and Biological Evaluation of MAO-A Selective 1,4-Disubstituted-1,2,3,6 tetrahydropyridinyl Substrates. *Bioorg Med Chem Lett* 10: 3031–3041.

Blackburn D. (1991) Evolutionary origins of the mammary gland. *Mammal Rev* 21 : 81-96.

Bortolato M., Chen K., Shih J. (2010) The degradation of Serotonin: Role of MAO. *Handbook of Behavioral Neuroscience* 21: 203-218.

Bradley S. (2007) Ecology of bat reproduction. *Biosciences* 3: 1-3.

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Briskin C., O'Malley B. (2010) Hormone Action in the Mammary Gland. Cold Spring Harb Perspect Biol 2: 1-15.

Camacho M. (2002) Análisis de capturas y recapturas de *Myotis velifer* (Chiroptera: Vespertilionidae) en tres localidades del eje volcánico transversal. Servicio social de licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana. 38 p.

Capuco A. M., Akers R. M. (1999) Mammary Involution in Dairy Animals. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2: 137-143.

Collier R., Hernández L., Horseman N. (2012) Serotonin as a homeostatic regulator of lactation. Domestic Animal Endocrinology 43: 161-170.

Collins J., Schandl C., Young K., Vesely J., Willingham M. (1997) Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. Histochem Cytochem 45:923–934

Crichton E., Krutzsch P. (2000) Reproductive Biology of Bats. Academic Press. 426 p.

Dahlberg A. (1971) Dental Morphology and Evolution. University of Chicago Press. 211 p.

Daniel C., Silberstein B. (1987) Postnatal development of the rodent mammary gland. En: The Mammary Gland: Development, Regulation, and Function; Plenum Press. 625 p.

Das S., Isobe N., Nishibori M., Yoshimura Y. (2006) Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. *Reproduction* 132: 781-790.

Davis R. (1969). Growth and development of young pallid bats *Antrozous pallidus*. *J Mammal* 50: 729-736

Davis W., Barbour R., Hassell M. (1968) Colonial behaviour of *Eptesicus fuscus*. *J Mammal* 49: 44-50.

Davis R., Herreid II C., Short H. (1962) Mexican free-tailed bats in Texas. *Ecol monographs* 32: 311-346.

Dell L.A., Kruger J.L., Bhagwandin A., Jillani N., Pettigrew J., Manger P. (2010) Nuclear organization of cholinergic putative catecholaminergic and serotonergic systems in the brains of two microchiropteran species. *J Chem Neuroanat* 40: 177-195.

Dulbecco R., Allen W., Bologna M., Bowman M. (1986). Marker evolution during the development of the rat mammary gland: Stem cells identified by markers and the role of myoepithelial cells. *Cancer Res.* 46: 2449–2456.

Evarts J., Rasweiler J., Behringer R., Hennighausen L., Robinson G. (2004) A Morphological and Immunohistochemical Comparison of Mammary Tissues from the Short-Tailed Fruit Bat (*Carollia perspicillata*) and the Mouse. *Biol reprod* 70: 1573-1579.

Eguiarte L. (2006) Los Murciélagos en México. *Arqueología mexicana. Naturaleza y cultura.* Instituto de Ecología UNAM. 10 p.

Ferguson J., Schor A., Howell A., Ferguson M. (1992) Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle. *Cell Tiss Res* 268:167–177.

Fitch J., Shump K., Shump A. (1981) *Myotis velifer*. *Mammalian species* 149: 2.

Fleming T, Eby P. (2003) Ecology of bat migration. En: *Bat Ecology*. 798 p.

Francis C., Anthony E., Brunton J., Kunz T. (1994) Lactation in male fruit bats. *Nature* 367: 691-692.

Ganesh A., Bogdanowicz W., Haupt M., Ganapathy M., Rajan K. (2010) Role of olfactory bulb serotonin in olfactory learning in the greater short-nosed fruit bat *Cynopterus sphinx* (Chiroptera: Pteropodidae). *Brain res* 1352: 108-117.

Gannon W., Sikes R. (2007) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal* 88: 819.

Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501.

Gleiman D. (2003) Grzimek's animal life encyclopedia: Mammals. Gale. 480 p.

Hayssen V., Van Tienhoven A., Van Tienhoven A. (1993) *Asdell's Patterns of Mammalian Reproduction: A compendium of species-specific data*. Cornell University. 1023 p.

Harvey M., Altenbach S., Best T. (2011) *Bats of the United States and Canada*. Johns Hopkins University Press. 224 p.

Heideman P. (1988) The timing of reproduction in *Haplonycteris fischeri* Lawrence (Pteropodidae): geographic variation and delayed development. *J Zool* 215: 577-595.

Henninghausen L., Robinson G., Wagner K., Liu X. (1997) Prolactin signaling in mammary gland development. *J Biol Chem* 272: 7567-7569.

Holschneider D., Shih J. (2000) Monoamine oxidase: basic and clinical perspectives. *Psychopharmacology - The fourth generation of progress.*

Consultado 25 de febrero 2013. Disponible en:

<http://www.acnp.org/g4/GN401000046/Default.htm>

Hood W., Oftedal O., Kunz T. (2006) Variation in body composition of female big brown bats (*Eptesicus fuscus*) during lactation. *J Comp Physiol B* 176: 807-19.

Howlett A., Bissell M. (1993) Influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. *Epithelial Cell Biol* 2: 79–89.

Hughes P., Speakman J., Jones G., Racey P. (1989) Suckling behavior of the pipistrelle bat (*Pipistrellus pipistrellus*). *J Zool* 230: 541-555.

Hurley L., Thompson A. (2001) Serotonergic innervation of the auditory brainstem of the mexican free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*. *The journal of comparative neurology* 435: 78-88.

IUCN (2008) 2008 IUCN Red List of Threatened Species. Consultado 5 de octubre 2012. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org>.

Jiménez-Trejo F., Tapia-Rodríguez M., Queiroz D., Padilla P., Avellar M., Rivas-Manzano P., Manjarrez-Gutiérrez G., Gutiérrez-Ospina G. (2007) Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies. *J Androl* 28:136-149.

Jiménez-Trejo F., León-Galván M.A., Martínez-Méndez L.A., Tapia-Rodríguez M., Mendoza-Rodríguez A., González-Santoyo I., López-Wilchis R., Vela-Hinojosa C., Baranda-Ávila N., Cerbón-Cervantes M.A. (2013) Serotonin in testes of bat *Myotis velifer* during annual reproductive cycle: Expression, localization, and content variations. *J Exp Zool A* 319: 249-258.

Johansen P., Wolf W., Kuhn D. (1991) Inhibition of tryptophan hydroxylase by benserazide and other catechols. *Biochem Pharmacol* 41:625–628.

Körtner G., Geiser F. (2000) The temporal organization of daily torpor and hibernation: Circadian and circannual rhythms. *Chronobiol Int* 17: 103-128.

Kulzer E. (1962) Über die jugendentwicklung der Angola-Bulldogfledermaus *Tadarida (Mops) condylura* (Molossidae). Säugtierkundliche Mitteilungen 10: 116-124.

Kunz T. (1974) Feeding Ecology of a Temperate Insectivorous Bat (*Myotis Velifer*). Ecology 55: 693-711

Kunz H., Anthony E. (1982) Age estimation and post natal growth in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. J Mammal 63: 23- 32.

Kunz T., McCracken G. (1996) Tents and harems: apparent defense of foliage roosts by tent-making bats. J Trop Ecol 12: 103-116

Kunz T., Oftedal O., Robson S., Kretzmann M., Kirk C. (1995) Changes in milk composition during lactation in three species of insectivorous bats. J Comp Physiol 164: 543-551.

Kurta A., Bell G., Kenneth N., Kunz T. (1989) Energetics of Pregnancy and Lactation in Freeranging Little Brown Bats (*Myotis lucifugus*). Physiol Zool 62: 804-818.

Krutzsch P. (2009) The reproductive biology of the cave myotis (*Myotis velifer*). Acta Chiropterologica 11: 89-90.

Laporta J., Peters T., Merriman K., Vezina C., Hernández L. (2013) Serotonin (5-HT) affects expression of liver metabolic enzymes and mammary gland glucose transporters during the transition from pregnancy to lactation. *Plos one* 8: 1-9.

Lawrence R.A., Lawrence R.M. (1999) *Breastfeeding: A guide for the medical profession*. Elsevier Mosby. 76 p.

Lee E., Lee W., Kaetael C., Parry G., Bissell M. (1985). Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: Regulation of casein gene expression and secretion. *Proc Natl Acad Sci* 82: 1419–1423.

León Galván M., López Wilchis R., Hernández Pérez O., Arenas Ríos E., Rosado A., Edwards C. (2005) Male reproductive cycle of mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Southwest Nat* 50: 453-460.

Li M., Liu X., Robinson G., Bar-Peled U., Wagner K., Young S., Henninghausen L., Furth P. (1997) Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc Natl Acad Sci* 94: 3425-3430.

Lillegraven J., Thompson S., McNab B., Patton J. (1987) The origin of eutherian mammals. *Biol J Linnean Soc* 32: 281-336.

López-Wilchis R. (1989) Biología de *Plecotus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae) en el Estado de Tlaxcala, México. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 227 p.

Lund L., Romer J., Thomasset N., Solberg H., Pyke C., Bissell M., Danø K., Werb Z. (2006) Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependant pathways. *Development* 122: 181-193.

Naoi M., Maruyama W., Akao Y., Yi H., Yamaoka Y. (2006) Involvement of type A monoamine oxidase in neurodegeneration: regulation of mitochondrial signaling leading to cell death or neuroprotection. *J Neural Transm Suppl* 71: 67-77.

Neuweiler G. (2000) *The biology of bats*. Oxford University Press. 320 p.

Nowak R., Pillsbury E. (1994) *Walker's bats of the world*. Johns Hopkins University Press. 288 p.

Nyugen A., Pollard J. (2000) Transforming growth factor beta3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development*. 127: 3107-3118.

Malgor L., Valsecia M. (2005) *Farmacología médica*. Mc Graw Hill. 195 p.

Marshall A., Nommsen L., Hernández L., Dewey K., Chantry C., Gregerson K., Horseman N. (2010) Serotonin transport and metabolism in mammary gland regulates secretory activation and involution. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 837-846.

Martinet J., Houdebine L. (1999) *Biology of lactation*. Editions Quae. 670 p.

Maseko B., Manger P. (2007) Distribution and morphology of cholinergic, catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of Schreiber's long fingered bat, *Miniopterus schreibersii*. *J Chem Neuroanat* 34: 80-94.

Mateos A. (1995) Variaciones morfoestructurales y ultraestructurales del ovario y de las células gonadotropas del microquiróptero *Myotis myotis* durante el ciclo anual. Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. 97 p.

Mather H., Keenan T. (1998) The cell biology of milk secretion: Historical notes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3: 227–232.

Matsuda M., Imaoka T., Vomachka A., Gudelsky G., Hou Z., Mistry M. Bailey J., Nieport K., Walther D., Bader M., Horseman N. (2004) Serotonin regulates mammary gland development via Autocrine-Paracrine Loop. *Dev Cell* 6: 193-203.

McCracken G., Gustin M. (1991) Nursing behaviour in Mexican free-tailed bats maternity colonies. *Ethology* 89: 305-321.

Mejía J., Ervin F., Baker G., Palmour R.M. (2002) Monoamine oxidase inhibition during brain development induces pathological aggressive behavior in mice. *Biol Psychiatry* 52: 811-821.

Mills E., Topper Y. (1970) Some ultrastructural effects on insulin, hydrocortisone and prolactin on mammary gland explants. *J Cell Biol* 44: 310-328.

Muschler J., Streuli C. (2010) Cell–Matrix Interactions in Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10: 1-13.

Muukherjee A., Washburn L., Barnerjee M. (1973) Role of Insulin as a 'Permissive' Hormone in Mammary Gland Development. *Nature* 246: 159-160.

Oftedal O. (2002) The mammary gland and its origin during Synapsid evolution. *J Mammary gland Biol Neoplasia* 7: 225-249.

Pearson P., Koford M., Pearson A. (1952) Reproduction of the lump-nosed bat (*Corynorhinus rafinesque*) in California. *J Mammal* 33: 237-320

Pitelka D. (1988) The mammary gland. En: *Cell and Tissue Biology*. Elsevier Science. 1219 p.

Popa-Lisseanu A., Voigt C. (2009) Bats on the move. *J Mammal* 90: 1283–1285.

Pond C. (1977) The significance of lactation in the evolution of mammals.

Evolution 31: 177-199.

Presnell J., Schreibman M. (1997) Humason's Animal Tissue Techniques. Johns Hopkins University Press. 572 p.

Priego T., Sánchez J., García A.P., Palou A., Picó C. (2013) Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats. Lipids 48: 481-95.

Racey P. (1974) Aging and assessment of reproductive status of pipistrelle bats *Pipistrellus pipistrellus*. J Zool 173: 264-271.

Racey P. (1975) The prolonged survival of spermatozoa in bats. En: The biology of the male gamete. Academic Press. 460 p.

Racey P. (1988) Reproductive assessment in bats. En: Ecological and Behavioral methods for the study of bats. Smithsonian Institution Press. 556 p.

Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. (2008) Farmacología. Elsevier. 830 p.

Richert M., Schwertfeger K., Ryder J., Anderson S. (2000) An Atlas of Mouse Mammary gland development. J Mammary Gland Biol Neoplasia 5: 227-239.

Rzedowski J. (1978) Vegetación de México. Limusa. 432 p.

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres -Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Rama ejecutiva de los Estados Unidos Mexicanos, Ciudad de México.

Sikes R.S., Gannon W.L., the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists (2011) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. J Mammal 92: 235–253.

Sluiter J. (1954) Sexual maturity in bats of the genus *Myotis*. Proc Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen 57: 696-700.

Stern A., Kunz T., Studier E., Oftedal O. (1997) Milk composition and lactational output in the greater spear-nosed bat, *Phyllostomus hastatus*. J Comp Physiol B 167: 389-98.

Sternlicht M. (2006) Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. Breast Cancer Res 8: 201.

Strange R., Li F., Saurer S., Burhardt A., Friis R. (1992) Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development* 115: 49-58.

Strelkov P. (1969). Migratory and stationary bats (Chiroptera) of the European part of the Soviet Union. *Acta Zool Cracoviensia* 14: 393–435.

Streuli C., Schmidhauser C., Bailey N., Yurchenco P., Skubitz A., Roskelley C., Bissell M. (1995). Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol* 129: 591–603.

Stull M., Vaibhav P., Vomachka A., Marshall A., Jacob G., Horseman N. (2007) Mammary Gland Homeostasis Employs Serotonergic Regulation of Epithelial Tight Junctions. *PNAS* 42: 16708-16713

Terranova P., Taylor C. (1999) Apoptosis (cell death). En: *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press. 4768.

Tinkle D., Patterson I. (1965) A Study of Hibernating Populations of *Myotis velifer* in Northwestern Texas 46: 612-633.

Torsten S., Salomonis N., Gusterson B.A. (2007) Mammary gland involution as a multi-step process. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12: 25-26.

Twente J. (1955) Some aspects of habitat selection and other behavior of cave dwelling bats. *Ecology* 26: 706-732.

Vaibhav P., Horseman N. (2008) Biphasic regulation of mammary epithelial resistance by serotonin through activation of multiple pathways. *J Biol Chem* 283 : 30901–30910.

Vaibhav P., Marshall A. (2011) Intraluminal volume homeostasis: A common serotonergic mechanism among diverse epithelia. *Commun Int Biol* 4: 532-533.

Villa R. (1967) Los murciélagos de México. Su importancia en la economía y la salubridad: su clasificación sistemática. Instituto de Biología UNAM. 491 p.

Visvader J. (2009) Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 23: 2563–2577.

Wade K. (2011) Development of the mammary gland (Mammogenesis). *Biol lact* 4: 342-460.

Wang Z., Liang B., Racey P., Wang Y.L., Zhang S.Y. (2008) Sperm Storage, Delayed Ovulation, and Menstruation of the Female Rickett,s Big-Footed Bat (*Myotis ricketti*). *Zool Studies* 47: 215-221.

Watson C., Kreuzaler P. (2011) Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int J Dev Biol* 55: 757-62.

Watson C. (2006) Key stages in mammary gland development - Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* 8: 203.

Webb P., Speakman J., Racey P. (1992) Inter- and intraspecific variation in wing loading and body mass in female pipistrelle bats: Theoretical implications for flight performance. *J Zool Lond* 228: 669–673.

Willingham C. (1999) Cytochemical methods for the detection of Apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 9: 1101–1109.

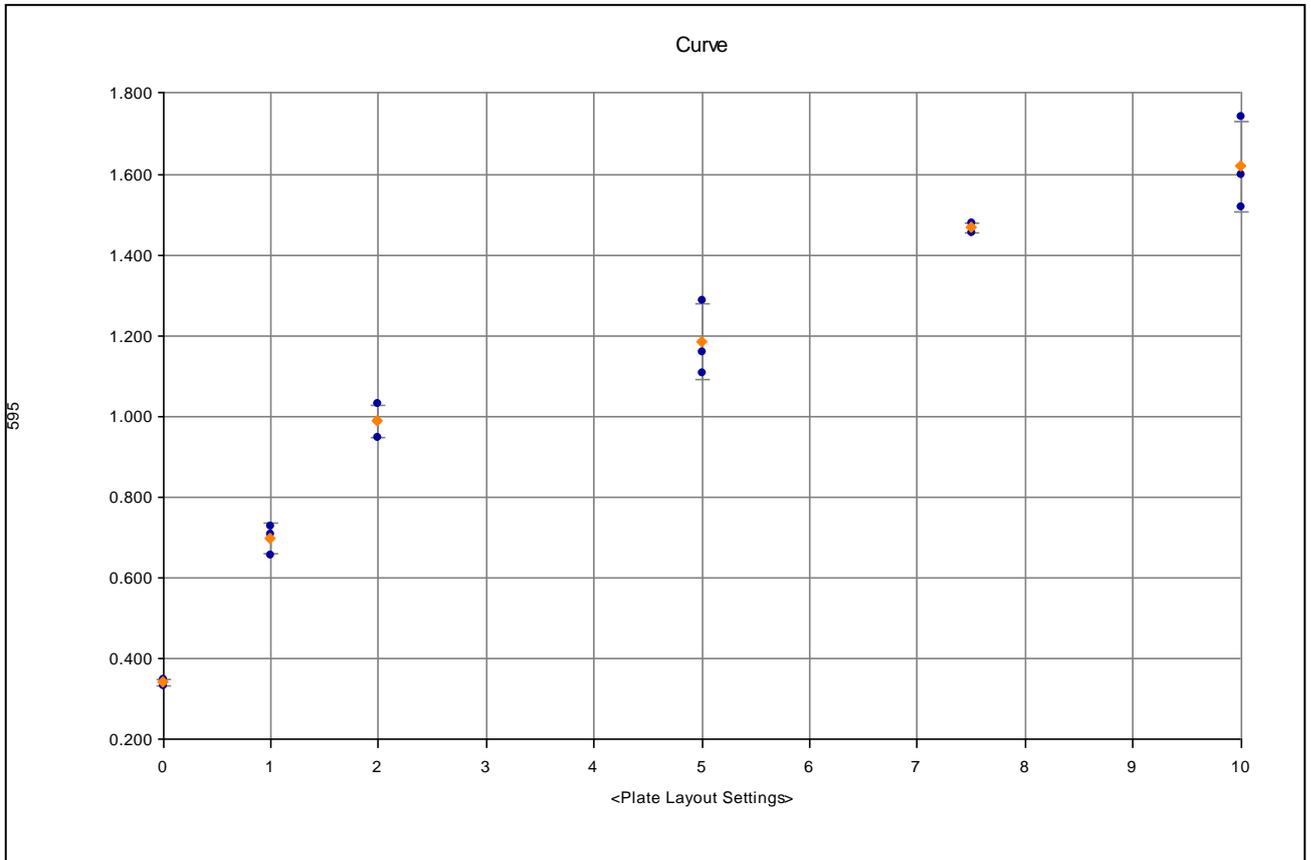
Wilson D., Cole F., Nichils J., Rudran R., Foster M. (1996) *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Mammals*. Smithsonian Institution Press. 480 p.

Wiseman B., Werb Z. (2002) Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Science* 296: 1046–1049.

Whitaker-Azmitia P. (1999) The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacol* 21:2S–8S.

ANEXO I

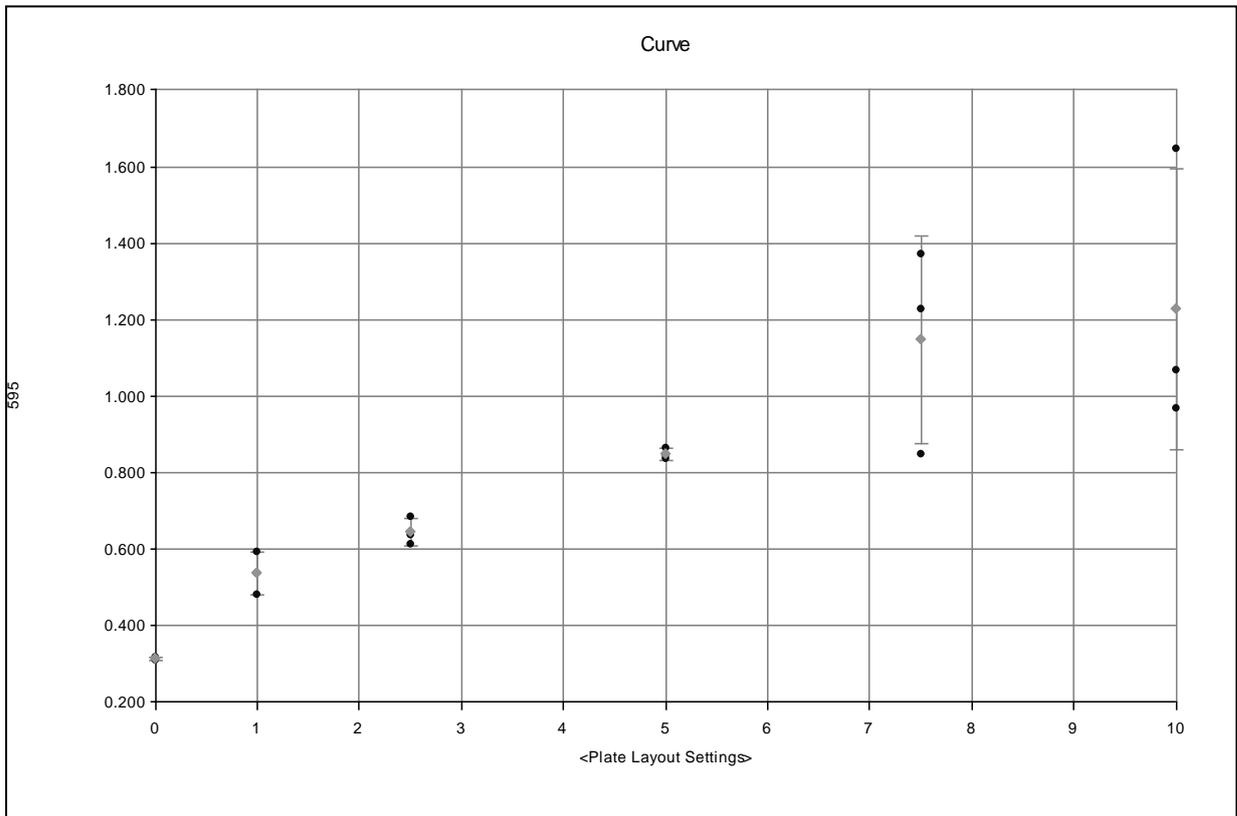
Ejemplo de curva estándar y cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford para análisis por Western Blot.



Curve Name	Curve Formula	A	B	R2	Fit F Prob
Myotis	$Y=A*X+B$	0.116	0.557	0.912	?????

Name	Well	Conc/Dil	595	Conc	Count	Mean	Std Dev	CV (%)
CER	A4	1	0.709	1.312	3	1.212	0.323	26.7
	A5	1	0.655	0.85				
	A6	1	0.728	1.473				
G1	A7	2	0.987	3.707	3	3.722	0.353	9.49
	A8	2	1.03	4.083				
	A9	2	0.948	3.377				
G2	A10	5	1.288	6.309	3	5.418	0.807	14.9
	A11	5	1.106	4.735				
	A12	5	1.161	5.209				
G3	B1	7.5	1.454	7.736	3	7.844	0.105	1.34

Ejemplo de curva estándar y cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford para HPLC.



Curve Name	Curve Formula	A	B	R2	Fit F Prob
Curve	Y=A*X+B	0.0901	0.396	0.967	?????

Name	Well	595	Conc	Count	Mean	Std Dev	CV (%)
julio	B7	0.57	1.923	2	2.265	0.484	21.4
	B8	0.631	2.608				
mayo	B9	0.751	3.935	2	4.055	0.17	4.18
	B10	0.772	4.175				
julio rep	B11	0.95	6.147	2	6.513	0.517	7.94
	B12	1.016	6.879				
agosto rep	C1	0.767	4.121	2	5.171	1.485	28.7
	C2	0.957	6.221				
cerebro	C3	0.537	1.558	2	1.28	0.393	30.7
	C4	0.487	1.002				

ANEXO II

Técnica de Hematoxilina-Eosina

1. Desparafinado:

Xileno I (5 minutos)
Xileno II (5 minutos)
Xileno-etanol (1:1) (5 minutos)

2. Hidratación:

Etanol anhidro I (5 minutos)
Etanol anhidro II (5 minutos)
Etanol 96° (3 minutos)
Etanol 80 ° (3 minutos)
Etanol 60 ° (3 minutos)
Agua destilada (3 minutos)

3. Tinción: Hematoxilina (5 minutos)

4. Lavado agua corriente

5. Diferenciación: 3 lavados con etanol ácido

6. Lavado agua corriente

7. Azuleamiento: Substituto de Scott (1 minuto)

8. Lavado agua corriente

9. Contrastado: Eosina (3 minutos)

10. 3 Lavados con agua destilada

11. Deshidratación:

Etanol 96° I (3 minutos)
Etanol 96° II (3 minutos)
Etanol anhidro I (3 minutos)
Etanol anhidro II (3 minutos)
etanol anhidro-xileno (1:1) (3 minutos)
xileno I (2 minutos)
xileno II (2 minutos)

ANEXO III

Reactivos y soluciones

a) BIO-RAD Laboratories, Inc. Hercules, CA. 94547-1898. United States:

* 30% Acrylamide/Bis Solution, 19:1 #161-0154

* TEMED (Tetrametiletilenediamina) #161-0801

* Protein Assay Dye Reagent Concentrate #500-0006

b) Santa Cruz Biotechnology, Inc.:

* Hematoxylin (CAS 517-28-2)

* Eosin Y bis(tetrabutylammonium salt) 80% (CAS 123333-95-9)

c) SIGMA-Aldrich Co, LLC:

* Tritón X-100 (4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)phenil-polietileno glicol)). Disolución 1% (10 µL en 1 mL de PBS).

Solución de Acrilamida-Bis (Bradford) (25 ml):

5 ml 30% Acrylamide/Bis Solution

20 ml Agua destilada

Solución 1.5 M tris-HCl pH 8.8

Tris.base 18.5 g

Agua destilada 100 ml

Ajustar pH a 8.8 con HCl

Solución 0.5 M tris-HCl pH 6.8

Tris base 6g

Agua destilada 100ml

Ajustar pH a 6.8 con HCl

Persulfato de Amonio al 10% (10 ml)

Persulfato de amonio 1g

Agua destilada 10 ml

SDS al 10% (10 ml)

SDS 1g

Agua destilada 10 ml

Geles para electroforesis

a) Gel de resolución (20ml):

7.9 ml de agua destilada

6.7 ml de Acrylamide mix 30%

5 ml de 1.5 M Tris (pH 8.8)

0.2 ml de SDS 10%

0.2 ml de persulfato de amonio 10%

0.008 ml de TEMED

b) Stacking gel (10ml):

6.8 ml de agua destilada

1.7 ml de Acrylamide mix 30%
1.25 ml de 1.5 M Tris (pH 8.8)
0.1 ml de SDS 10%
0.1 ml de persulfato de amonio 10%
0.01 ml de TEMED

Buffer de lisis (50 ml)

NP-40 (Nonyl fenoxipolietoxietanol) 1% v/v (0.5 ml)
Desoxicolato de sodio 0.5% (0.5 ml al 5%)
SDS 0.1% (0.5 ml al 10%)
Pastilla de inhibidores RIPA (1)
Aforar a 50 ml con PBS 1x

Buffer de carga (10 ml)

Volumen final : 9 ml
50mM Tris-HCl (pH 6.8) (2 ml)
100 mM DTT Bme 5% (1 ml)
2% (w/v) SDS (electrophoresis grade) (0.4 g/ 4 ml al 10%)
0.1% Bromophenol (0.02 g)
10% (v/v) glicerol (2 ml)

Buffer de corrida (1x) (1L)

Tris Base 3 g
Glicina 1.44 g

SDS 1 g

Aforar a 1L con agua destilada

Buffer de transferencia 1x

Volumen final : 1 L

70% Agua destilada (700 ml)

20% Metanol absoluto (200 ml)

10% Buffer de transferencia 10x (100 ml)

Buffer de transferencia 10 x (1L)

14.8 g Glicina

29 g Tris base

1.85 g SDS

Aforar a 1L con agua destilada

TBS (10x) (1L)

50g NaCl (Cloruro de sodio)

2g KCl (Cloruro de potasio)

30 g Trisbase

Aforar a 1L con agua destilada

PBS 5x (1L)

1.2 g KH₂PO₄ (Fosfato de potasio monobásico)

7.2 g Na₂HPO₄ (Fosfato de sodio dibásico heptahidratado)

40 g NaCl (Cloruro de Sodio)

0.1 g KCl (Cloruro de Potasio)

Aforar a 1L con agua destilada

Leche al 5%

1 g de leche descremada en 20 ml de TBS-tween



**DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA Y EXPRESIÓN DE
LA SEROTONINA EN LA GLÁNDULA MAMARIA
DEL MURCIÉLAGO *MYOTIS VELIFER*: ASPECTOS
RELEVANTES DURANTE LA LACTANCIA.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

BIÓLOGO CRISTIÁN VELA HINOJOSA

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTOR DR. MIGUEL ANGEL LEÓN
GALVÁN

CODIRECTOR DR. FRANCISCO JAVIER
JIMÉNEZ TREJO

ASESOR M. EN C. GERARDO LÓPEZ
ORTEGA

