



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“LA APOPTOSIS EN LA PRÓSTATA Y GLÁNDULAS AMPULARES A LO LARGO
DEL CICLO REPRODUCTIVO ASINCRÓNICO DE *Corynorhinus mexicanus*”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA
BIOL. BEDA BENITO ALEMÁN
2202800666

bedaaleman95@gmail.com

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Mario García Lorenzana
mglo@xanum.uam.mx

ASERORES:

Dr. Miguel Ángel León Galván
leon@xanum.uam.mx
Dr. Rosa Angélica Lucio Lucio
lucioral@yahoo.com.mx

JURADO:

Presidente:

Dr. Miguel Ángel León Galván
leon@xanum.uam.mx

Secretaria:

Dr. Rosa Angélica Lucio Lucio
lucioral@yahoo.com.mx

Vocales:

Dra. Edith Arenas Ríos
editharenas2000@yahoo.com.mx
Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón
ahiezerrod@yahoo.com.mx

27-Abril-2023, Iztapalapa, CDMX

Declaración de originalidad

El que suscribe **Beda Benito Alemán**, alumno del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada:

Declaro que:

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el **17 de abril del 2023**.

Atentamente



Beda Benito Alemán

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 17 de abril de 2023

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

La que suscribe Beda Benito Alemán alumna con número de matrícula 2202800666, del posgrado maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación LA APOPTOSIS EN LA PRÓSTATA Y GLÁNDULAS AMPULARES A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO ASINCRÓNICO DE *Corynorhinus mexicanus* a desarrollar en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

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



Beda Benito Alemán

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Mario García Lorenzana

Lab. de Biología e Ingeniería Tisular Neuroinmunoendocrina, Área de
Neurociencias, Depto. de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
lorenzanagm@gmail.com, mglo@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. León Galván Miguel Ángel

Lab. de Biología y Ecología de Mamíferos, Depto. Biología
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
miguelangeleongalvan@gmail.com, leon@xanum.uam.mx

Asesora

Dra. Rosa Angélica Lucio

Lab. de Neurobiología, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Universidad Autónoma de Tlaxcala
lucioral@yahoo.com.mx

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. León Galván Miguel Ángel

Lab. de Biología y Ecología de Mamíferos, Depto. Biología
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
miguelangelleongalvan@gmail.com, leon@xanum.uam.mx

Dra. Rosa Angélica Lucio

Lab. de Neurobiología, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta,
Universidad Autónoma de Tlaxcala
lucioral@yahoo.com.mx

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Lab. de Ecología y Biología de Mamíferos
Depto. de Biología
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
ahiezerrod@yahoo.com.mx

Dra. Edith Arenas Ríos

Lab. de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide
Depto. de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
editharenas2000@yahoo.com.mx

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo de la beca No. 1079915 y a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), registro 003797.

Al Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Al Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

MIEMBROS DEL JURADO

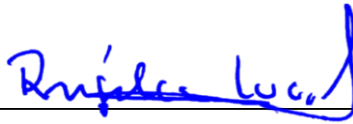
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**LA APOPTOSIS EN LA PRÓSTATA Y GLÁNDULAS AMPULARES A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO ASINCRÓNICO DE *Corynorhinus mexicanus***” con fecha 27 de abril de 2023.



Presidente

Dr. León Galván Miguel Ángel

Lab. de Biología y Ecología de Mamíferos, Depto. Biología
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa



Secretaria

Dra. Rosa Angélica Lucio

Lab. de Neurobiología, Centro Tlaxcala de Biología de la
Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala



Vocal

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Departamento de Biología
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa



Vocal

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

DEDICATORIA

A mis padres, Jacinto Benito y Lucina Alemán, por su amor y apoyo, siempre han estado para mí. A ellos les dedico todo lo que he logrado. Desde el momento en que decidí volar hacia un lugar distinto, ellos han confiado en mí, les agradezco sus oraciones, que siempre me han acompañado y me han ayudado a lograr lo que he querido.

A mi hermana María Guadalupe, que me ha enseñado mucho. Con cada ocurrencia y sonrisa siempre me alegra, me carga de ánimos y me motivaba a seguir.

A mis hermanos Ramiro, Elia, Arturo, que no importando la distancia siempre estarán para mí. Les agradezco el apoyo de alguna forma me han brindado.

Al amor de mi vida, Ranferi Suárez, por siempre apoyarme de todas las formas que han estado en sus manos. Le agradezco por estar conmigo a lo largo del camino, por todo el amor que me ha brindado.

A mis abuelos, Elías Benito y Beda Maldonado. Aunque ya no estén físicamente siempre los llevare conmigo.

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiarme y ser mi fortaleza en estos años transcurridos, por brindarme la sabiduría para concluir esta etapa de mi vida. A Él le agradezco cada minuto de mi vida.

A María Guadalupe Peñaloza, porque nunca dudó de mí, sin conocerme me apoyó y me enseñó que mi recompensa sería doble.

Al Dr. Miguel Angel León Galván por siempre orientarme, le agradezco esas horas que siempre me brindó. Gracias por compartirme su conocimiento y por generar las diversas dudas que siempre enriquecían este proyecto. Gracias por los recursos brindados para poder concluir el trabajo.

Al Dr. Mario García Lorenzana, le agradezco la paciencia que siempre me tuvo, por el conocimiento brindado, por guiarme y motivarme para poder terminar el proyecto. Gracias por brindarme recursos y así poder finalizar este proyecto.

A la Dra. Rosa Angélica Lucio, por motivarme desde el primer día que la conocí, siempre tenía palabras de aliento. Gracias por brindarme su conocimiento a pesar de la distancia y ser tan atenta.

A la Dra. Edith Arenas, que desde que decidí ingresar a la maestría, ella siempre me orientó y me brindó su conocimiento hasta el día de hoy. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, donde siempre tuve apoyo.

Al Dr. Ahiezer, por siempre guiarme, desde el primer momento, por corregirme. Por orientarme esas veces que sentía que ya no podía, sus consejos siempre han sido importantes en mi formación.

A Blanca Patricia López, le agradezco el haberme apoyado, por la paciencia que siempre me tuvo. Cuando sentía que no podía, estuvo ahí.

A Alejandro Soto Castruita por el apoyo y el material proporcionado. Gracias por la orientación.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Gihovani, Edwin, Isa, Yessi, Julio, Landa, Dany, Ricardo. Gracias por sus consejos y la ayuda que siempre me han brindado. La convivencia con ustedes hizo, sin duda, esta etapa más llevadera, aun en los momentos malos.

A mis compañeros de generación, Ale, Yess, Miriam y Julio. Aun en las condiciones que nos tocaron siempre fuimos unidos, y nos apoyamos en lo que se podía. Siempre tuvimos palabras de motivación unos con otros. No se olvidan esas veces que siempre nos echábamos porras.

RESUMEN

Los quirópteros presentan numerosas adaptaciones reproductivas. En algunas especies, las glándulas sexuales accesorias experimentan cambios estacionales en su tamaño y actividad relacionado con el patrón reproductivo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*, especie monoéstrica estacional asincrónica y cuenta con glándula ampular y próstata. Estos órganos muestran cambios en su tamaño a lo largo su ciclo reproductivo; en la etapa de inicio de crecimiento (agosto) presentan un incremento en su longitud y peso. Posteriormente ocurre la etapa de máximo tamaño (noviembre), y es cuando ocurren los apareamientos. En la etapa de involución (enero) tanto la glándula ampular como la próstata inician un decremento en tamaño para alcanzar un mínimo en la etapa de inactividad (marzo-julio). Considerando los cambios de tamaño de estos órganos en esta especie, es importante realizar estudios para profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan los cambios de tamaño en la próstata y la glándula ampular. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue aportar información sobre la apoptosis como parte del mecanismo de regulación de los cambios de tamaño que ocurren en las principales etapas del ciclo anual de la próstata y las glándulas ampulares en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Este proyecto se realizó obteniendo glándulas ampulares y próstata de dos individuos en cada una de las cuatro etapas (inactividad, inicio de crecimiento, máximo tamaño, involución). Mediante la técnica histológica se determinaron los tipos celulares y apoptosis con la técnica de TUNEL. Se comprobó que las glándulas ampulares y la próstata presentan dos tipos de células en su epitelio: células basales y secretoras; mientras que, en el estroma se observaron células musculares lisas y fibroblastos; las evidencias de apoptosis se presentaron en todos los tipos celulares mencionados, tanto en la etapa de máximo tamaño como en la de involución. El índice apoptótico fue en general alto, igual o superior a 84% tanto para la glándula ampular como para la próstata, en las cuatro etapas estudiadas. El análisis histológico también permitió reconocer que el número de vasos sanguíneos presentes en las etapas de máximo tamaño e involución de ambas glándulas estudiadas, fue mayor en comparación con lo registrado en las

etapas de inactividad e inicio de crecimiento, lo que permite reconocer la existencia de una dinámica de desarrollo de la vasculatura asociada al ciclo de las glándulas sexuales accesorias.

ABSTRACT

Bats have numerous reproductive adaptations. In some species, the accessory sex glands experience seasonal changes in their size and activity related to the reproductive pattern of the bat *Corynorhinus mexicanus*, a seasonal asynchronous monestrous species that has an ampullary gland and prostate. These organs show changes in their size throughout their reproductive cycle; in the stage of beginning of growth (August) they present an increase in their length and weight. Subsequently, the stage of maximum size (November) occurs, and that is when mating occurs. In the involution stage (January) both the ampullary gland and the prostate begin to decrease in size to reach a minimum in the inactive stage (March-July). Considering the size changes of these organs in this species, it is important to carry out studies to deepen the knowledge of the mechanisms that regulate the size changes in the prostate and ampullary gland. Therefore, the objective of this project was to provide information on apoptosis as part of the regulation mechanism of size changes that occur in the main stages of the annual cycle of the prostate and ampullary glands in the bat *Corynorhinus mexicanus*. This project was carried out by obtaining ampullary glands and prostate glands from two individuals in each of the four stages (inactivity, beginning of growth, maximum size, involution). Using the histological technique, cell types and apoptosis were determined with the TUNEL technique. It was verified that the ampullary glands and the prostate present two types of cells in their epithelium: basal and secretory cells; while, in the stroma, smooth muscle cells and fibroblasts were observed; the evidence of apoptosis was presented in all the mentioned cell types, both in the stage of maximum size and involution. The apoptotic index was generally high, equal to or greater than 84% for both the ampullary gland and the prostate, in the four stages studied. The histological analysis also allowed us to recognize that the number of blood vessels present in

the stages of maximum size and involution of both studied glands was greater compared to what was registered in the stages of inactivity and beginning of growth, which allows recognizing the existence of a developmental dynamic of the vasculature associated with the cycle of the accessory sexual glands.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Patrones reproductivos en quirópteros	12
1.2. Patrón reproductivo masculino del murciélago <i>Corhynorhinus mexicanus</i>	13
1.3. Glándulas sexuales accesorias	14
1.4. Generalidades de la apoptosis.....	21
2. ANTECEDENTES.....	24
2.1. Participación de la apoptosis en el ciclo de actividad de órganos reproductivos.....	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	26
5. HIPÓTESIS	26
6. OBJETIVO GENERAL	26
6.1. Objetivos particulares	27
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
8. MATERIAL Y MÉTODOS	29
8.1. Material biológico	29
8.2. Técnica histológica y análisis tisular	31
8.3. Detección y cuantificación de apoptosis	34
8.4. Análisis estadístico de los datos	36
9. RESULTADOS	37
9.1. Análisis histológico.....	37
9.1.1. Glándulas ampulares.....	37
9.1.2. Próstata (lóbulos ventral y dorsal)	41
9.1.3. Presencia de vasos sanguíneos.....	45
9.2. Detección y cuantificación de apoptosis	46
9.2.1. Número total de células	46
9.2.2. Número total de células apoptóticas	49
9.2.3. Número de células con evidencia de apoptosis por tipos celulares	51
10. DISCUSIÓN	58
10.1. Análisis histológico.....	59
10.2. Detección y cuantificación de apoptosis	63

10.2.1. Número total de células	65
10.2.2. Número total de células con apoptosis	67
10.2.3. Tipos celulares con presencia de apoptosis.....	68
11. CONCLUSIÓN.....	68
12. PERSPECTIVAS	69
13. ANEXOS	70
13.1. Anexo I Técnica histológica	70
13.2. Anexo II Técnica de TUNEL	72
14. BIBLIOGRAFÍA	75

1. INTRODUCCIÓN

Los murciélagos pertenecen al orden Chiroptera, uno de los grupos más diversos de mamíferos, ocupando el segundo lugar después de los roedores. Los murciélagos cuentan con 227 géneros y 1386 especies (Burgin *et al.*, 2018), ampliamente distribuidas y pueden encontrarse en la mayoría de los continentes (Santos *et al.*, 2018). Estos organismos presentan numerosas adaptaciones reproductivas. En los machos estas adaptaciones incluyen regresión testicular, almacenamiento de espermatozoides y estacionalidad en los órganos reproductores, lo que los hace un modelo ideal para estudiar cambios estacionales a lo largo de los ciclos reproductivos (Danmaigoro *et al.*, 2014). A pesar de lo antes mencionado, poco estudiados se han realizado en relación entre la ciclicidad reproductiva masculina con la fisiología de las glándulas sexuales accesorias y las variaciones estacionales (Puga *et al.*, 2014; Miotti *et al.*, 2018), debido a que, en algunas especies, estas glándulas experimentan cambios estacionales en tamaño y actividad relacionado con el patrón reproductivo de estas especies (Beguelini *et al.* 2015b; Mohammed y Doohi, 2017).

1.1. Patrones reproductivos en quirópteros

La amplia distribución geográfica y la consecuente variación de los factores abióticos, como: temperatura, humedad, precipitación y disponibilidad de alimento que influyen directamente en los patrones reproductivos de los quirópteros (Fleming *et al.*, 1972). Entre las diferentes especies de murciélagos, existen 3 patrones reproductivos masculinos. El tipo I es sincrónico y se caracteriza porque la espermatogénesis y los apareamientos se llevan a cabo al mismo tiempo durante el ciclo reproductivo anual; en el tipo II, los apareamientos ocurren antes de que termine la espermatogénesis y; el tipo III es asincrónico, por lo que existe un desfase entre la espermatogénesis y los apareamientos. Este último patrón involucra un periodo prolongado de espermatozoides en la cauda del epidídimo, por lo que los apareamientos se llevan a cabo con la reserva de espermatozoides almacenados en la cauda del epidídimo y los fluidos seminales provenientes de las glándulas sexuales accesorias, que en esta temporada del año se encuentran

activas y en su máximo desarrollo (Krutzsch, 2000), como ocurre en la especie de estudio, *Corhynorhinus mexicanus* (López-Wilchis, 1989).

1.2. Patrón reproductivo masculino del murciélago *Corhynorhinus mexicanus*

Corynorhinus mexicanus es un murciélago plecotínido perteneciente a la familia Vespertilionidae. El aparato reproductor masculino de *C. mexicanus* consta de testículos y epidídimos, ambos tipos de órganos pareados. Además, conductos deferentes, un complejo de glándulas sexuales accesorias, que hasta el momento se han identificado las glándulas ampulares y la próstata, que dirigen su producto hacia la uretra, y por último el pene (León-Galván *et al.*, 2005). Esta especie de quiróptero presenta un patrón reproductivo asincrónico temporal dado que la espermatogénesis ocurre en primavera-verano (mayo-septiembre), mientras que las cópulas ocurren en los meses de noviembre y diciembre debido al almacenamiento espermático epididimario que ocurre en otoño-invierno (septiembre-febrero) y al plasma producido por las glándulas sexuales accesorias (Figura 1) (López-Wilchis, 1989).

							Almacenamiento prolongado en el epidídimo				
		Espermatogénesis						Cópula			
MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGOS	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB
						Ciclo de las glándulas sexuales accesorias					
Inactividad					Crecimiento			Máximo tamaño	Involución		

Figura 1. Patrón reproductivo estacional asincrónico del macho de *Corynorhinus mexicanus* en donde se muestran las principales etapas dentro del ciclo anual: la espermatogénesis reinicia de mayo-septiembre; meses antes de que se lleven a cabo las cópulas.

Las glándulas sexuales accesorias inician su crecimiento en los meses de agosto y continúan su crecimiento hasta octubre, para alcanzar su máximo justo cuando ocurren los apareamientos, después inician una etapa de involución (enero-febrero) y al final inician un periodo de inactividad de marzo a julio, manteniendo un mínimo

tamaño (Figura 1 y 2) (López-Wilchis, 1989; León-Galván *et al.*, 2005; Cervantes *et al.*, 2008; (López-Wilchis, 1989, Rodríguez-Tobón *et al.*, 2010).

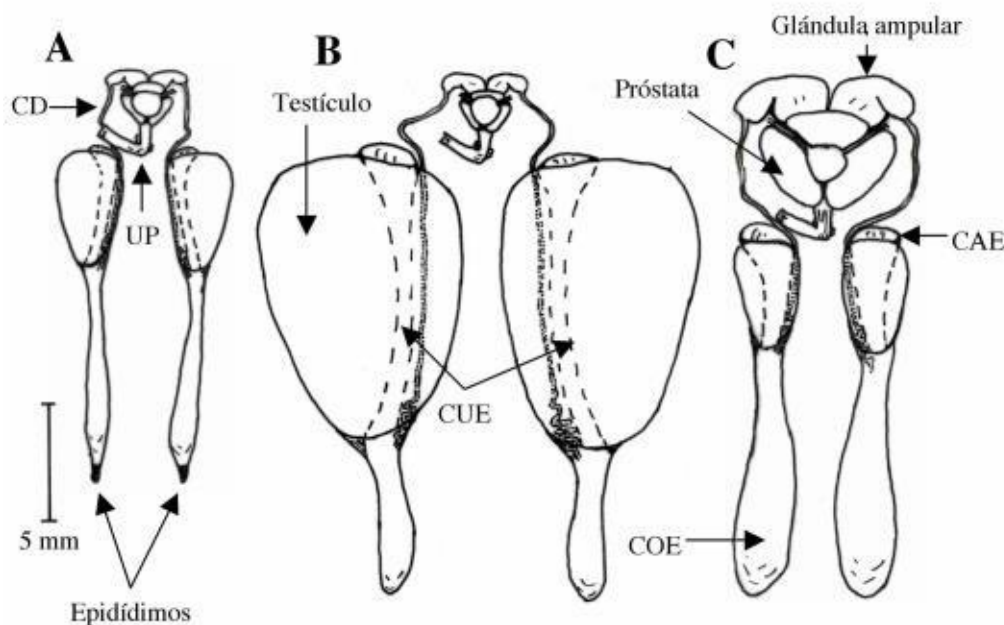


Figura 2. Esquematación de los principales cambios macroscópicos que se presentan en los diferentes órganos reproductores masculinos del murciélago *Corynorhinus mexicanus* a lo largo del ciclo anual. A) Condición inactiva de la reproducción (marzo): los testículos y epidídimos presentan su menor tamaño; la actividad de espermatogénesis se encuentra en receso. El tamaño y peso de las glándulas sexuales accesorias (próstata y glándulas ampulares) está al final de la regresión. B) Etapa de espermatogénesis completa: los testículos se encuentran en su máximo tamaño, los epidídimos muestran gran crecimiento y las glándulas sexuales accesorias presentan un ligero incremento en su tamaño (agosto). C) Etapa de apareamiento, los individuos tienen espermatozoides almacenados en la cauda del epidídimo, aun cuando ya no se lleva a cabo la espermatogénesis y los testículos disminuyeron en tamaño; las glándulas sexuales accesorias han alcanzado su máximo tamaño y las cópulas se llevan a cabo (noviembre). CD= Conducto deferente, CAE, CUE y COE= cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, respectivamente; UP= uretra peneana (Tomado de: Rodríguez-Tobón *et al.*, 2010).

1.3. Glándulas sexuales accesorias

El sistema reproductor masculino se compone de diversos órganos, partiendo de los testículos, conductos eferentes, túbulo epididimario y finalmente el conducto deferente, y un complejo de glándulas sexuales accesorias que, aportarán el plasma seminal (Prins y Lindgren, 2015) , en el carnero y el toro aproximadamente el 70%

del eyaculado corresponde a este plasma, mientras que el restante son espermatozoides; en los camélidos aproximadamente el 85% del eyaculado pertenece al plasma seminal y 15% de espermatozoides (Ershaw-Young y Maxwell, 2012).

Las glándulas sexuales accesorias son importantes para la fertilización exitosa de los mamíferos debido a los componentes que secretan, y que, conforman el plasma seminal (prostaglandinas, fructosa, ácido cítrico, poliaminas, zinc y enzimas como proteasas y fosfatasas ácidas). Estas secreciones glandulares sirven para nutrir, activar y proteger a los espermatozoides, así como para limpiar la uretra masculina de restos de orina antes de la expulsión seminal. Además, sirven de transporte para los espermatozoides, y aseguran la viabilidad y movilidad de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, entre otras funciones (Puga *et al.*, 2014).

Una vez que los espermatozoides son inseminados y se encuentran al interior del aparato reproductor femenino, estos pueden ser reconocidos como cuerpos extraños por el sistema inmune (Poiani, 2006); sin embargo, en especies que almacenan espermatozoides de manera prolongada se ha evidenciado que la actividad de las células inmunitarias puede ser suprimida por diferentes componentes del plasma seminal, entre estos están las prostaglandinas; la proliferación de linfocitos puede inhibirse por las poliaminas, esperminas y espermidina, entre otras. En murciélagos que almacenan espermatozoides, se ha observado que el tracto reproductor se encuentra libre de leucocitos (Crichton, 2000); lo que contrasta con las especies de murciélagos que no almacenan espermatozoides durante periodos prolongados (*Miniopterus schreibersii*), en donde, después de la inseminación, el útero es invadido por leucocitos (Racey, 1979). Por otro lado, en el murciélago *Myotis lucifugus* se ha observado la presencia de una proteína proveniente del plasma seminal, la cual inhibe la movilidad uterina y el sistema fagocítico, eventos que permiten la retención de espermatozoides por más tiempo (Hunter *et al.*, 1971). Lo anterior resalta una parte importante de la participación de las glándulas sexuales accesorias en especies que almacenan espermatozoides por tiempos prolongados tanto el tracto reproductor masculino

como el femenino, como lo es la especie de este estudio, *C. mexicanus* (Rodríguez-Tobón *et al.*, 2010).

En los mamíferos en general, las glándulas sexuales accesorias conforman un conjunto complejo de órganos y estructuras que comprende: la próstata, las vesículas seminales, las glándulas ampulares que se encuentran ubicadas de forma cercana entre sí, y son muy conspicuas, pero que también incluyen a otros órganos asociados a la uretra, como es el caso de las glándulas uretrales, las bulbouretrales o glándulas de Cowper, y las parauretrales o glándulas de Littre (Kruttsch, 2000), que por su tamaño pequeño, pueden estar ubicados en una estrecha cercanía con la próstata, pasan muchas veces desapercibidos a la vista común y por tanto, no han recibido la misma atención en cuanto a su investigación. En el caso de los quirópteros, todas las especies estudiadas presentan próstata (Kruttsch, 2000; Beguelini *et al.*, 2016), tienen variaciones morfológicas considerables entre especies, pero dada la riqueza de especies, la diversidad de patrones reproductivos y la variabilidad en la organización anatómica, entre las diferentes especies se reconocen cambios en lo concerniente a la presencia-ausencia de cada una de estas glándulas (Puga *et al.*, 2013; Negrin *et al.*, 2014; Christante *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015, 2016; Beguelini *et al.*, 2016; Miotti *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Pimentel *et al.*, 2023), lo que los hace un grupo muy interesante e importante de estudiar en cuanto a esta variabilidad morfológica y también respecto a la relación de los periodos de actividad de las glándulas respecto al periodo de actividad de otros órganos, principalmente del testículo, como es en aquellas especies que tienen un patrón reproductivo masculino asincrónico (León-Galván *et al.*, 2005).

Respecto a la presencia-ausencia, ubicación anatómica, composición, morfología y organización histológica de las glándulas accesorias, estas varían entre las diferentes especies de murciélagos (Martins *et al.*, 2015). A manera de ejemplos que permiten reconocer estas variaciones podemos citar los casos de *Artibeus lituratus* (Santos *et al.*, 2018) y *A. planirostris* (Puga *et al.*, 2013) que, presentan un complejo prostático, glándulas parauretrales y un par de glándulas bulbouretrales, con ausencia de vesículas seminales y glándulas ampulares;

mientras que *Rhinolophus ferrumequinum* presenta próstata, glándulas ampulares y vesículas seminales formando un complejo, más la glándula uretral (Sohn *et al.*, 2021).

Por su parte, *C. mexicanus*, especie del presente estudio, el complejo más conspicuo de glándulas sexuales accesorias está formado por la próstata y un par de glándulas ampulares, de las cuales ya se cuenta con una descripción de sus cambios morfológicos gruesos asociados al ciclo reproductivo de la especie (León-Galván *et al.*, 2005), y aunque presenta otras glándulas sexuales como las glándulas bulbouretrales y seguramente otros tipos de glándulas o de tejido glandular asociado a la uretra, estas últimas, no han sido descritas hasta el momento. El estudio de la organización histológica está en proceso (Soto-Castruita, datos no publicados), hasta el momento se ha evidenciado que la próstata es una glándula única, con una forma complicada de describir pero de la que se distinguen un lóbulo ventral, un par de lóbulos laterales y un par de lóbulos dorsales; sin embargo, para fines prácticos del presente trabajo, se considerará a la próstata conformada por un lóbulo ventral y un par de lóbulos dorso-laterales. Es una glándula con una estructura redondeada bilobulada, que rodea la base de la vejiga, está cubierta por una cápsula de tejido conectivo denso irregular con fibras elásticas y abundantes fibras de músculo liso, y presenta adenómeros tubulares. Respecto a la glándula ampular son órganos pares ubicados en la parte terminal del conducto deferente, y que se distinguen de este por su mayor tamaño y forma curva; presenta adenómeros túbulo-alveolares con un revestimiento de epitelio secretor simple que se observa desde cúbico hasta cilíndrico (Soto-Castruita, datos no publicados). Hasta el momento no existen estudios que aporten información sobre las secreciones que estas glándulas sexuales accesorias producen en *C. mexicanus*.

Como parte de su organización anatómica fundamental, la próstata se conforma de un sistema ductal cuya ramificación contiene en conjunto todas las estructuras glandulares: acinos, túbulos y conductos para la concentración y conducción del fluido que ahí se produce y drenan directamente a un mismo conducto excretor en la parte inicial de la uretra (uretra prostática). Los sistemas ductales de cada una de las glándulas ampulares cuentan con un conducto que

pasa muy cercano a la próstata y drena hacia la uretra, y en conjunto, ambas glándulas ampulares en su porción proximal a la uretra, tienen un impacto en la forma de lo que es parte dorso-lateral de la próstata. Anatómicamente, este sistema ductal se puede regionalizar en tres zonas: proximal, intermedia y distal con respecto a la uretra (Lee *et al.*, 1990).

La regionalización de la próstata cambia entre las diferentes especies de murciélagos, en algunas se presentan dos regiones (dorsal y ventral) (Puga *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015; Miotti *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018). En otras especies se observa la presencia de 3 regiones (ventral, dorsolateral y dorsal) (Martins *et al.*, 2016). Otra organización de la próstata se presenta en miembros de la familia Molossidae, en los que esta glándula muestra un patrón semilobulado que consiste en una región ventral única y grande, y una región dorsal trilobulada (Christante *et al.*, 2015). En cuanto a su organización histológica, la próstata también puede presentar variaciones en cuanto al tipo de epitelio de las diferentes regiones anatómicas. Un ejemplo de esto es la especie *A. lituratus*, que entre las regiones dorsal y ventral de la próstata, el epitelio cambia de pseudoestratificado cúbico compacto a pseudoestratificado de cubico a cilíndrico respectivamente; aunque en ambas regiones el epitelio presenta células secretoras y basales (Santos *et al.*, 2018).

De manera general, se puede considerar que la próstata secreta diversas sustancias como zinc, ácido cítrico, fosfatasa ácida y gamma-glutamyltransferasa, entre otras y en general secreta un fluido alcalino que protege a los espermatozoides inseminados de las secreciones vaginales y el moco cervical que son ácidos (Mokkapati y Dominic, 1976; Lozano, 2018). La próstata contribuye aproximadamente con un 25% del eyaculado (Prins y Lindgren, 2015).

Tanto la glándula ampular como la próstata están constituidas histológicamente por un compartimento epitelial y un compartimento estromal. Se han descrito dos tipos celulares epiteliales en la próstata de algunos murciélagos: células secretoras y células basales. Las células secretoras epiteliales tienen núcleo redondo y parabasal, son más abundantes y presentan variaciones de tamaño y forma entre las diferentes etapas del ciclo reproductivo de la especie. En cuanto a

las células basales, estas se encuentran por debajo de las células secretoras y se diferencian de éstas últimas porque su núcleo es alargado, son menos abundantes dentro del epitelio, y se encuentran firmemente adheridas a la membrana basal de cada adenómero. En cuanto al estroma, este compartimento se muestra muy delgado y contiene diversos tipos celulares como las del músculo liso, fibroblastos y las correspondientes células que conforman las diferentes capas de vasos sanguíneos y linfáticos (Santos, *et al.*, 2018; Pimentel *et al.*, 2023) (figura 3).

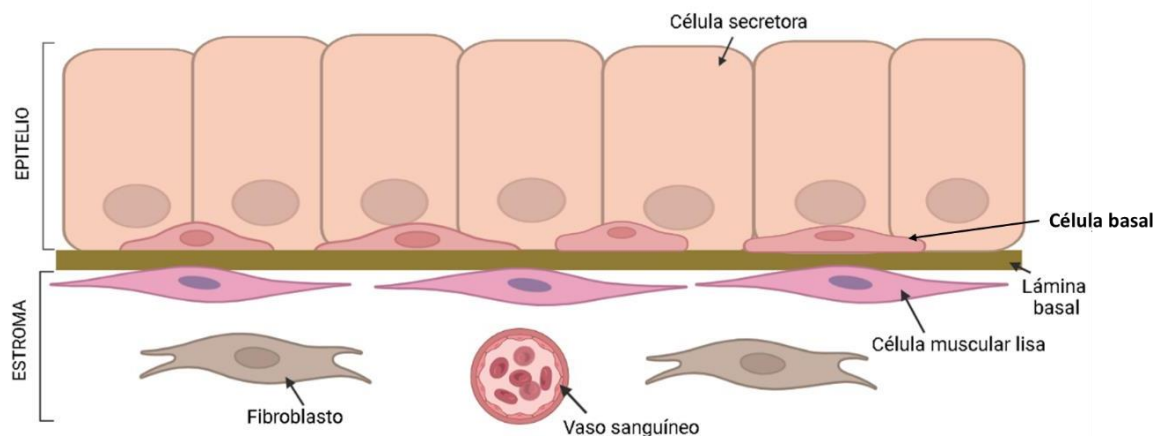


Figura 3. Representación esquemática de la organización histológica de la próstata, donde se pueden apreciar principales tipos celulares que la conforman. En el epitelio prostático se localizan las células basales de núcleo alargado, adosadas directamente a la lámina basal, y células secretoras que presentan núcleos redondos parabasales. El compartimento estromal, que rodea los adenómeros prostáticos, está compuesto por diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran las células musculares lisas, los fibroblastos y componentes vasculares.

Las células musculares lisas forman una capa continua que rodea a los adenómeros prostáticos, mientras que los fibroblastos son más escasos, se encuentran localizados en la periferia de la capa muscular periacinar de forma aislada (figura 4). También se pueden observar fibroblastos entre las células musculares y la membrana basal del adenómero glandular (Quintar, 2009).

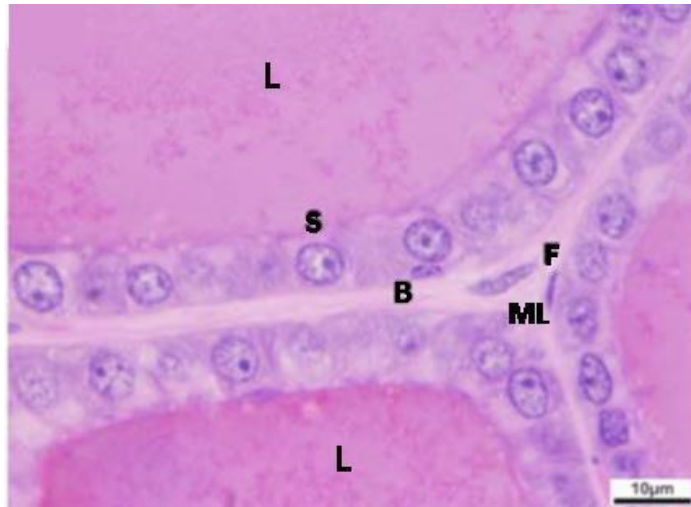


Figura 4. Fotomicrografía de un corte histológico de la región dorsal de la próstata de *Artibeus lituratus*, donde se pueden reconocer los diferentes tipos celulares que conforman esta región. Teñido con hematoxilina-eosina. L, lumen; S, célula secretora; B, célula basal; ML, célula muscular lisa (modificado de Santos *et al.*, 2018, se agregó las iniciales ML para señalar a una célula muscular).

Las glándulas ampulares son órganos pares, en forma de dilataciones que son agrandamientos glandulares asociados a las partes distales del conducto deferente (Chow *et al.*, 1995; Mohammed y Doohi, 2017). Estas glándulas se estrechan pasan por debajo de la próstata y vacían su contenido en el colículo seminal (Mahmud *et al.*, 2016). Los productos de secreción de las glándulas ampulares tienen participación en la maduración (Bergerson *et al.*, 1994), nutrición y almacenamiento espermático (Saleh *et al.*, 2020).

Como parte de su regulación, las glándulas sexuales accesorias muestran un patrón constante de sensibilidad a los andrógenos y estrógenos. Una pequeña cantidad de hormonas esteroideas es producida en la corteza adrenal, en donde andrógenos como la dehidroepiandrosterona (DHEA) se convierten en otros andrógenos, como la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) por las enzimas presentes en las células de la próstata (Suzuki *et al.*, 2007; Labrie, 2011). Sin embargo, la mayor cantidad de testosterona es producida en los testículos por las células de Leydig, y una parte de estas hormonas es convertida a estradiol (E2). Dichas hormonas esteroideas, andrógenos y estrógenos pueden ejercer su acción

en diferentes células blanco a través de sus receptores específicos, los receptores de andrógenos (AR) y los receptores de estrógenos (ER) (Beguelini *et al.*, 2014). La testosterona testicular circulante puede llegar a las células epiteliales secretoras en donde se unirá a los AR y se convertirá en dihidrotestosterona (DHT), por la enzima 5- α -reductasa y en E2 por la enzima aromatasa, esta última se unirá a los ER para regular los procesos de proliferación y apoptosis (Lozano, 2018; Beguelini *et al.*, 2015a).

1.4. Generalidades de la apoptosis

La apoptosis (en griego, “*caída*” como en el caso de las hojas de los árboles) es un término acuñado por Kerr, Wyllie y Currie (1972). Es un tipo de muerte celular programada, es decir, la célula sigue una secuencia ordenada y controlada genéticamente que dirige a su propia muerte (De Toro, 2006). El proceso se lleva a cabo de manera individual, esto es, que las células vecinas no resultan dañadas. Involucra cambios morfológicos y bioquímicos. En estos cambios morfológicos, las células apoptóticas se caracterizan por presentar citoplasma compacto, condensación de cromatina nuclear, fragmentación del ADN, formación de burbujas en la membrana plasmática, a esto le siguen condiciones que hacen que el núcleo se rompa y que las células se desprendan de tejidos circundantes, así como la formación de cuerpos apoptóticos (llenos de orgánulos celulares muy compactos y fragmentos de núcleo) (Cascales, 2003; Elmore, 2007; Obeng, 2020). Los cambios bioquímicos implican: 1) activación de las caspasas (rompen muchas proteínas celulares vitales del andamiaje nuclear y del citoesqueleto); 2) fragmentación del ADN por endonucleasas (en oligonucleosomas en múltiplos de 180 a 200 pares de bases) y proteínas y; 3) cambios en la membrana plasmática, tales como la externalización de fosfatidilserina, este lípido será señal para que la célula apoptótica sea reconocida y fagocitada por células fagocíticas o por células que no son fagocíticas pero que ante esa señal responden como si lo fueran (Cascales, 2003; Elmore, 2007).

Se han descrito dos principales vías por las cuales se puede llevar a cabo la apoptosis:

La *vía extrínseca o de receptores de muerte*, se desencadena por la unión de un ligando a su receptor transmembranal, entre ellos, la proteína de superficie FAS, el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α y TNF- β), y el Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF (TRAIL). Estos ligandos se unen a sus receptores específicos: Receptor del TNF (TNFR), Receptor del Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionado con TNF (TRAILR), Receptor APO-1, también denominado Fas o CD9. Una vez que el ligando se une con su receptor ocurre su trimerización seguida del reclutamiento al oligómero de la proteína adaptadora FADD (proteína con dominio de muerte que se asocia a Fas) y de la unión, para su activación, de las pro-caspasas 8 y 10, conocidas como iniciadoras de la apoptosis. La estructura supramolecular es denominada Complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC). Las pro-caspasas son convertidas por hidrólisis parcial en caspasas activas, capaces de hidrolizar y activar a las pro-caspasas efectoras o ejecutoras de muerte (caspasas 3-7) (Figura 5) (Palacios *et al.*, 2011; Green y Llambi, 2015).

La *vía intrínseca* también conocida como *vía mitocondrial*, es activada desde el interior de la célula en respuesta a diversas señales negativas, como daño al ADN y la eliminación de factores de crecimiento. En esta vía, la permeabilización de la membrana externa mitocondrial se considera como el punto de no retorno. Cuando las células perciben una señal extracelular o intracelular, la membrana mitocondrial externa experimenta un cambio en su potencial, así como en su permeabilidad. Esto ocasiona la liberación de proteínas apoptóticas hacia el citosol: citocromo c, Factor-1 activador de las proteasas apoptogénicas (Apaf-1), endonucleasa G, factor iniciador de la apoptosis (AIF) y Smac/Diablo (segundo activador mitocondrial de caspasa). Una vez en el citosol, el citocromo c se une al factor activador de las proteasas apoptogénicas, que atrae la pro-caspasa iniciadora 9 y se forma un complejo llamado apoptosoma que activará a la caspasa 9 que hidrolizará a la pro-caspasa 3 para inducir su activación, conocida esta como ejecutora central de la apoptosis (Figura 5) (Palacios *et al.*, 2011; Green y Llambi, 2015).

Tanto la *vía extrínseca* como la *intrínseca* convergen en la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 que al activarse ocasionan la escisión de proteínas celulares denominadas endonucleasas, que, a su vez, ocasionarán la

fragmentación del ADN en el extremo 3' de la cadena en oligonucleosomas en múltiplos de 180 a 200 pares de bases (Figura 5) (Palacios *et al.*, 2011; Green y Llambi, 2015).

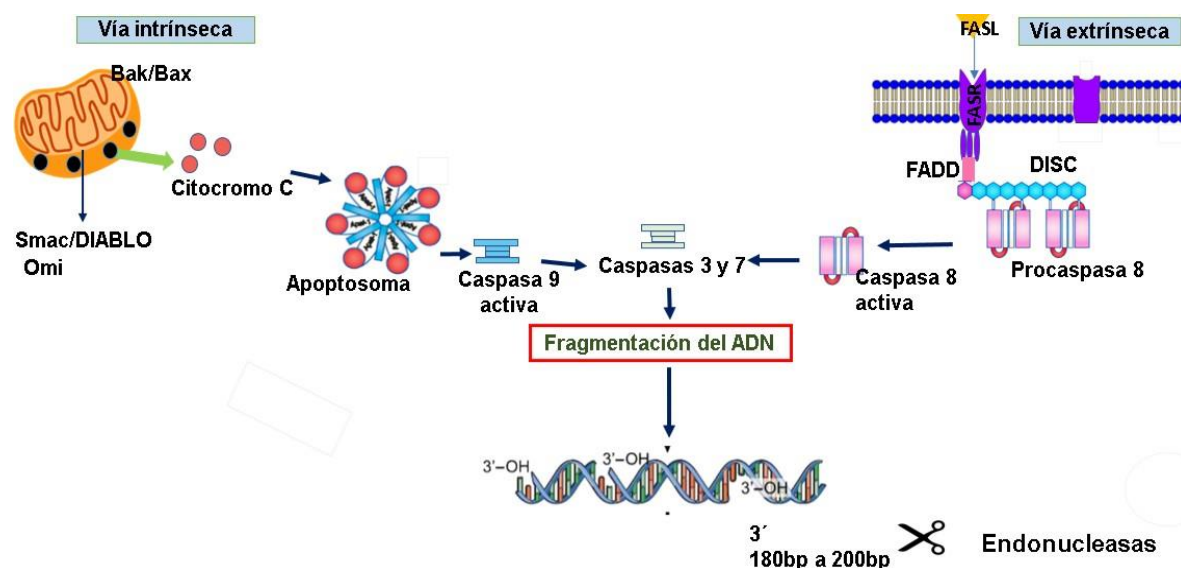


Figura 5. Vías intrínseca y extrínseca de señalización apoptótica. La *vía intrínseca* o de *receptores de muerte* inicia con la formación de poros en la membrana externa mitocondrial por Bak/Bax y libera al citocromo c, Smac/Diablo y Omi. El citocromo c se une al factor activador de las proteasas apoptogénicas, que atrae la procaspasa 9 y se forma el apoptosoma para activar a la caspasa 9, y esta a su vez activa a las caspasas 3 y 7. La *vía extrínseca de receptores de muerte* se desencadena por la unión de un ligando a su receptor transmembranal, entre ellos FAS que se une a su receptor FASR. Una vez unidos ocurre la trimerización y se recluta FADD (proteína con dominio de muerte que se asocia a Fas), esta unión se denomina Complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC), y es responsable de activar a la caspasa 8, que activa a las caspasas-3 y 7. La activación de las caspasas 3 y 7 en ambas vías ocasionan la escisión de proteínas celulares que ocasionan la fragmentación del ADN por endonucleasas que cortan el extremo el extremo 3' de la cadena de ADN de 180 a 200 pares de bases. (Palacios *et al.*, 2011; Green y Llambi, 2015).

La muerte celular programada ocurre durante el desarrollo y el envejecimiento del individuo y actúa como un mecanismo de homeostasis que ayuda a mantener las poblaciones celulares de los tejidos y órganos (Norbury y Hickson, 2001; Ziegler y Groscurth, 2004).

Los órganos sexuales masculinos de varias especies de murciélagos estacionales que han sido estudiadas muestran un crecimiento y regresión durante su ciclo reproductivo. La testosterona, la DHT y el estradiol son hormonas esteroides clave que regulan estos cambios (Beguelini *et al.*, 2014). Diversos estudios en especies de murciélagos indican que la apoptosis en órganos diana depende de estas hormonas (Beguelini *et al.*, 2015; Puga *et al.*, 2016).

Así, el testículo, el epidídimo y la próstata al ser privadas de hormonas esteroides incrementan su índice de apoptosis (Beguelini *et al.*, 2015a, b). Debido a que en *C. mexicanus* tanto la glándula ampular como la próstata presentan incremento en su tamaño, la apoptosis podría estar participando en los cambios de tamaño de estos órganos, por lo que esta investigación permitirá profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan los cambios de tamaño de estas glándulas sexuales accesorias, particularmente el de la apoptosis, involucrada en la dinámica de recambio celular que ocurre a lo largo del ciclo reproductivo de *C. mexicanus* debido a que son órganos fundamentales para su éxito reproductivo

2. ANTECEDENTES

2.1. Participación de la apoptosis en el ciclo de actividad de órganos reproductivos

Existen pocos estudios en los que se ha estudiado la apoptosis en las glándulas sexuales accesorias durante la etapa reproductiva de los mamíferos y la mayoría de ellos han sido realizados en roedores. Esos trabajos han estado enfocados en analizar el efecto de la privación de andrógenos en las glándulas sexuales accesorias (Kerr y Searle, 1973; Kyprianou e Isaacs, 1988; Tsuji *et al.*, 1998).

Hasta el momento, los únicos estudios enfocados en analizar la participación de la apoptosis en las glándulas sexuales accesorias de murciélagos han sido realizados sobre la próstata de dos especies frugívoras estacionales; una de ellas, *A. planirostris*, en donde se mostraron datos interesantes sobre la existencia de diferencias entre las regiones que conforman el órgano. En particular, para la región ventral de la próstata se observó un aumento notablemente significativo en el número de células que presentaron muerte por apoptosis en la estación de primavera comparado con otras estaciones climáticas del ciclo anual, esto

demuestra que esta región presenta gran cantidad de pérdida de células, seguramente asociado al recambio celular. Por otra parte, la región dorsal no muestra diferencias significativas durante las estaciones del año (Puga *et al.*, 2014). En el caso de *A. lituratus*, se presentan, diferencias en el índice de apoptosis entre las dos regiones de la próstata (ventral y dorsal). Durante todo el año la región ventral mostró gran cantidad de células positivas para caspasa-3 como indicador de apoptosis, mientras que para la región dorsal este indicador se mantuvo constantemente baja durante todo el año (Albernaz *et al.*, 2021).

Hasta el momento, no se han realizado estudios enfocados en determinar la participación de la apoptosis y sus variaciones, ya sea regional o estacional, en las glándulas sexuales accesorias a lo largo del ciclo reproductivo de especies estacionales que presenten un único evento reproductivo al año, y en particular de aquellas en las que existe un desfase temporal entre la espermatogénesis y los apareamientos, cuyos órganos sexuales presentan cambios contrastantes, tanto morfológicos como en cuanto a la actividad asociados a las diferentes etapas del ciclo reproductivo de la especie. Lo anterior permite considerar a *C. mexicanus* como un excelente modelo para estudiar la variación en el índice de apoptosis en las glándulas ampulares y la próstata a lo largo del ciclo reproductivo estacional asincrónico. Por lo cual, nuestro objetivo fue aportar información sobre la muerte celular por apoptosis como mecanismo de regulación en los cambios de tamaño de la próstata y las glándulas ampulares en el murciélago *C. mexicanus* durante el ciclo anual.

3. JUSTIFICACIÓN

La glándula ampular y la próstata de los murciélagos *Corynorhinus mexicanus* muestran cambios en su tamaño a lo largo de su ciclo reproductivo. En la etapa de inicio de crecimiento, en el mes de agosto presentan un incremento en su longitud y peso y continúan su crecimiento. Posteriormente, en noviembre ocurre la etapa de máximo tamaño, estas glándulas muestran un máximo aumento en longitud y peso, y es cuando ocurren los apareamientos. En la etapa posterior, involución en el mes de enero, tanto la glándula ampular como la próstata inician un decremento en tamaño para alcanzar un mínimo en la etapa de inactividad en los meses de

marzo a julio, donde se alcanza un mínimo de longitud y peso (León Galván *et al.*, 2005).

A la fecha, no se han realizado estudios en las glándulas sexuales accesorias a lo largo del ciclo reproductivo en especies estacionales que presentan un desfase temporal entre la actividad del testículo (espermatogénesis) y la época de apareamiento, como es el caso de *C. mexicanus*. La utilización de esta especie de murciélago como modelo biológico de estudio es importante para profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan los cambios de tamaño en la próstata y la glándula ampular de mamíferos que presentan marcados cambios morfológicos y en la actividad de las glándulas sexuales accesorias, particularmente en lo referente a la eliminación de células por apoptosis en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de la especie, ya que aún se desconoce cómo es la dinámica en el recambio celular de estos dos principales órganos que conforman el complejo de glándulas sexuales en esta especie y que son fundamentales para su éxito reproductivo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los cambios que ocurren en el índice de apoptosis asociados a los cambios de tamaño de la próstata y las glándulas ampulares durante el ciclo anual reproductivo del murciélago *Corynorhinus mexicanus*?

5. HIPÓTESIS

En el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, la próstata y las glándulas ampulares experimentan drásticos cambios de tamaño durante su ciclo reproductivo siendo el valor más alto en el índice de apoptosis en la etapa de involución.

6. OBJETIVO GENERAL

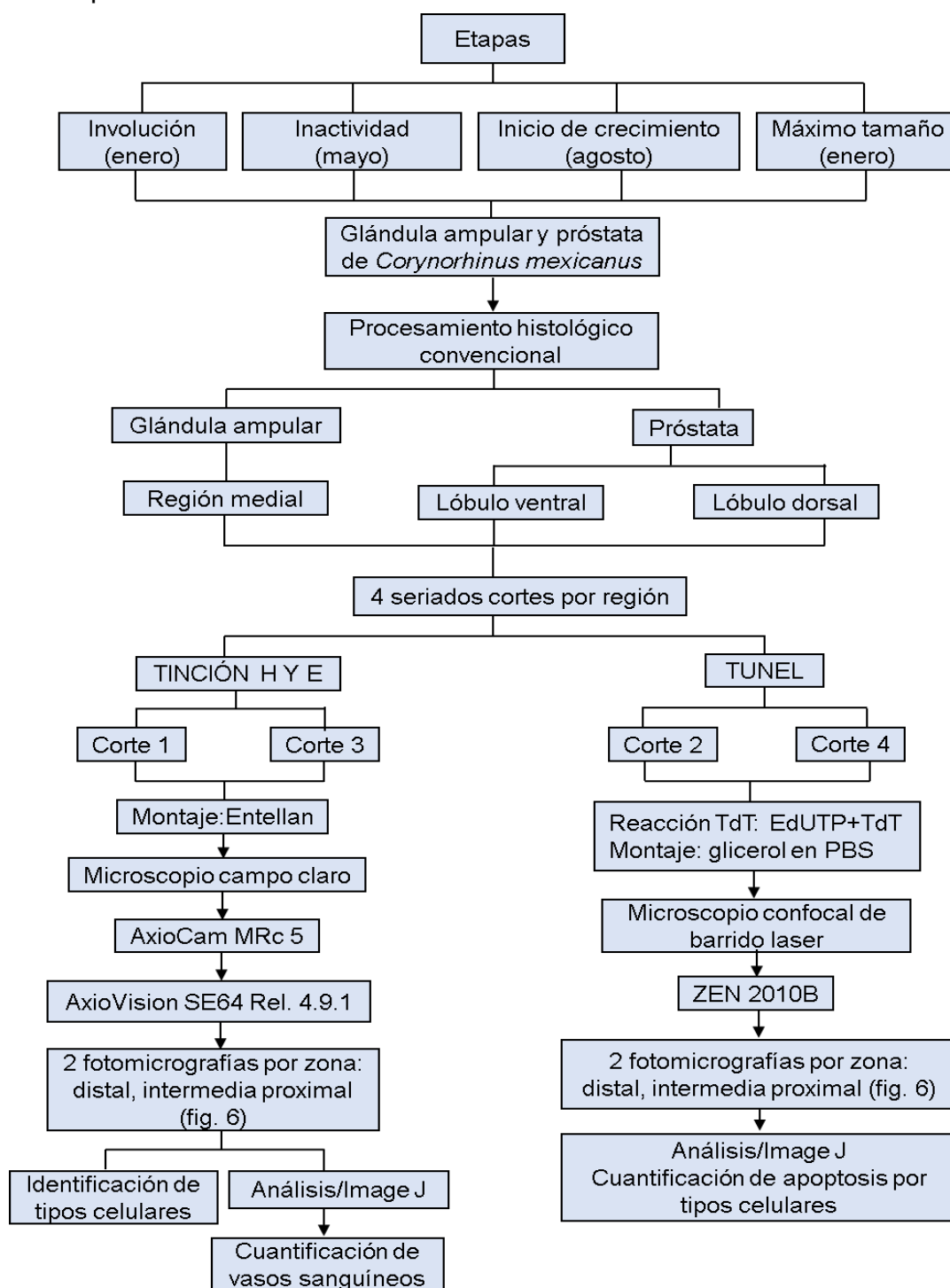
Aportar información sobre la participación que tiene la muerte celular por apoptosis como mecanismo de regulación de los cambios de tamaño que ocurren en las principales etapas del ciclo anual de la próstata y las glándulas ampulares en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

6.1. Objetivos particulares

- Identificar los tipos celulares que presentan apoptosis en la próstata y las glándulas ampulares durante las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *C. mexicanus*.
- Determinar el índice de apoptosis en la próstata y glándulas ampulares durante las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *C. mexicanus*.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización de los objetivos del presente trabajo se realizaron diferentes técnicas que se detallan a continuación:



8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Material biológico

Este proyecto se realizó con material biológico que forma parte de una colección científica alojada en el Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos de la UAM-I y, para su obtención, en su momento se contó con los permisos de colecta correspondientes. El material fue almacenado como parte de un proyecto de investigación divisional enfocado al estudio de los patrones reproductivos de la diversidad de murciélagos de México a lo largo de varios años. Por lo anterior, no se requirió capturar ni sacrificar nuevos ejemplares.

El manejo y desecho de los materiales biológicos y químicos en el laboratorio se realizó de acuerdo con la reglamentación institucional correspondiente, y en apego a los lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud y reglamentos de la Comisión de Ética de CBS de la UAM-I (Velásquez *et al.*, 2010).

Se utilizaron las glándulas ampulares y próstata de 2 machos adultos de la especie *Corynorhinus mexicanus* por cada una de las etapas clave que conforman el ciclo de cambios en tamaño y peso de las glándulas sexuales accesorias. Los datos de captura y los criterios de selección de los animales, la obtención, medición y procesamiento de los órganos hasta su almacenamiento se describen ampliamente en León-Galván *et al.* (2005). La tabla 1 muestra los datos sobre los individuos empleados en el estudio. Para establecer las etapas del ciclo de las glándulas sexuales accesorias en las que se agruparon los órganos de la especie de estudio, se emplearon los datos correspondientes al ciclo reproductivo de la especie en León-Galván *et al.* (2005), sobre la actividad de espermatogénesis como se describen en León-Galván (2008) y la información sobre el almacenamiento y maduración espermática epididimaria se determinaron por Rodríguez-Tobón (2011 y 2016) estableciendo para fines del presente estudio, las etapas como a continuación se describe:

Etapa I. inactividad (mayo). Las glándulas sexuales accesorias presentan su menor tamaño. Comienza (Reinicia) el crecimiento testicular y la fase proliferativa de la espermatogénesis; los epidídimos se mantienen pequeños.

Etapa II. Crecimiento (agosto). Las glándulas sexuales accesorias presentan un ligero incremento en su tamaño. Los testículos alcanzan su máximo tamaño, la espermatogénesis es completa; los epidídimos muestran gran crecimiento.

Etapa III. Máximo tamaño (noviembre). Las glándulas sexuales accesorias alcanzan su máximo tamaño. Los testículos experimentan regresión, llegando a su tamaño mínimo y la espermatogénesis ha cesado por completo; mientras que la cauda de los epidídimos se encuentra congestionada con espermatozoides.

Etapa IV. Involución (enero). Las glándulas sexuales accesorias se encuentran en regresión.

Los testículos se mantienen en su mínimo tamaño, mientras que, el tamaño de los epidídimos se va reduciendo.

Tabla 1. Datos de los individuos a partir de los cuales se obtuvieron las glándulas sexuales accesorias empleadas en el presente estudio.

Etapas del ciclo de las glándulas sexuales accesorias	Individuo	Fecha de captura (dd/mm/aaaa)	Peso corporal (gr)	Longitud de antebrazo (mm)	Glandulas ampulares (longitud latero-lateral) (mm)	Próstata (longitud latero-lateral) (mm)
I- Inactividad (mayo)	1	20/05/2000	7.1	42.2	4.1	2.2
	2	20/05/2000	8.2	41.3	2.6	1.9
II- Crecimiento (agosto)	1	19/08/2000	7.6	41.5	4.5	2.5
	2	19/08/2000	7.7	41.0	4.1	2.3
III- Máximo tamaño (noviembre)	1	19/11/2000	7.0	42.0	7.6	5.3
	2	19/11/2000	7.1	40.5	9.3	6.0
IV- Involución (enero)	1	30/01/2000	7.3	40.6	5.0	4.3
	2	26/01/2001	8.7	42.0	5.8	4.6

Se indica la etapa del ciclo de las glándulas sexuales accesorias establecidas para la conformación de los grupos de estudio, la fecha de captura y los datos somáticos y de las glándulas sexuales.

8.2. Técnica histológica y análisis tisular

Las glándulas sexuales accesorias de 8 murciélagos, 2 por cada una de las 4 etapas establecidas para la realización del presente estudio, fueron fijadas con solución de formalina al 4% (V/V) en solución amortiguada de fosfatos (PBS) pH 7.4. Al momento de la fijación, ambas glándulas se encontraban integrando un complejo que denominaremos: complejo de glándulas sexuales accesorias (Figura 6).

Las glándulas preservadas fueron sometidas a la técnica histológica estándar y fueron procesadas mediante deshidratación en concentración gradual de alcoholes, aclaramiento con xileno y se incluyeron en Paraplast plus (Prophet, 1992). Los órganos incluidos fueron cortados en un microtomo de rotación LEICA modelo 1510. Se obtuvieron cortes seriados longitudinales a través del complejo de glándulas sexuales accesorias, en el sentido súpero-inferior, para contar con secciones de los órganos en planos frontales de 7 µm de espesor (Anexo I). Las

secciones de tejido fueron montadas en un portaobjetos recubierto con poli-L lisina al 0.01% (V/V) como adherente tisular.

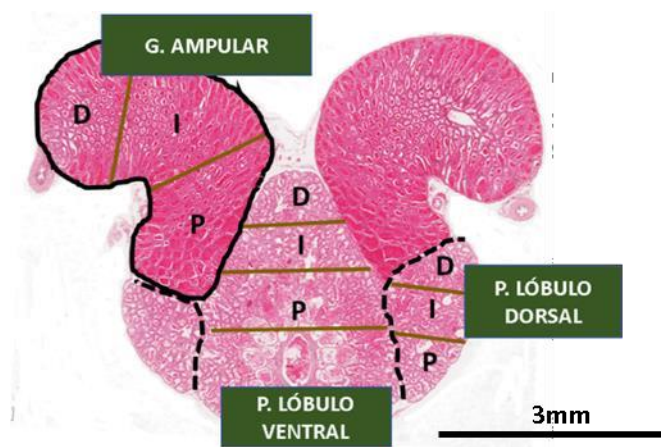


Figura 6. Fotomicrografía de una sección histológica en vista ventral del complejo de glándulas sexuales accesorias del murciélago *C. mexicanus*, en etapa de máximo tamaño, donde se puede apreciar la presencia de las glándulas ampulares (G. AMPULAR) y de la próstata con sus dos lóbulos, ventral (P. LÓBULO VENTRAL) y dorsal (P. LÓBULO DORSAL). Para fines de este estudio, cada glándula ampular y lóbulo de la próstata fue dividido en 3 zonas: P, proximal, I, intermedia, D, distal, con la finalidad de analizar la existencia de posibles diferencias en el índice de apoptosis entre ellas.

Con la finalidad de poder realizar una amplia revisión de cada órgano de estudio, se decidió realizar una regionalización anatómica. En el caso de la próstata se emplearon los cortes histológicos representativos del lóbulo medio dorsal y los correspondientes al lóbulo medio ventral, considerando el plano frontal como referencia. Debido a que, la glándula ampular no presenta regionalización anatómica (Soto-Castruita, datos no publicados), se consideró la región media del órgano orientado en sentido próximo-distal respecto a la próstata, para la realización de los cortes. De cada una de las regiones de estudio (3 regiones en total: una correspondiente a la glándula ampular, y los 2 lóbulos de la próstata) se seleccionaron 4 cortes histológicos seriados, tomados de la porción central de cada región anatómica de las glándulas, lo que permitió reconocer las características histológicas para fines de una mejor comprensión de su organización interna general, y realizar la detección de apoptosis en ambas regiones de los órganos. En

el caso de las glándulas ampulares, por ser órganos pareados, se utilizó siempre la glándula derecha de cada animal.

De los 4 cortes por región mencionados anteriormente, 2 de ellos (cortes 1 y 3) fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) (Allen, 1992), cubiertos con Entellan y observados en el campo claro de un microscopio Zeiss para realizar su revisión y descripción histológica. Las fotomicrografías se tomaron mediante la cámara digital AxioCam MRc 5, con el programa AxioVision SE64 Rel. 4.9.1, montada directamente al microscopio. De cada corte histológico se tomaron 6 fotomicrografías, dos por cada una de las tres zonas en las que se dividió el órgano o lóbulo: distal, intermedia y proximal, con respecto a la uretra como se señaló en la figura 6, ubicando el sitio de la toma de la imagen a lo largo del recorrido de la sección histológica en sentido superior-inferior del campo de visión del microscopio, se tomaron dos fotomicrografías (Quintar, 2009), con la finalidad de contar con una mayor cobertura de la estructura anatómica de cada órgano de estudio, y considerando que su organización anatómica corresponde a un sistema ductal glandular y buscando obtener información de las diferentes regiones que conforman a esta estructura funcional de la próstata y de la glándula ampular de *C. mexicanus*. Cada fotomicrografía obtenida fue analizada para realizar la identificación de estructuras histológicas clave y reconocer la condición en la que se encontraban los tejidos en cada etapa del ciclo anual de las glándulas. Para contar con evidencias del cambio en la estructura histológica de la próstata, de cada fotomicrografía donde se ubicó el sistema ductal se tomó al menos un adenómero donde se pudieron reconocer los dos compartimentos que la conforman: el estroma (musculo liso y tejido conectivo), y el sistema ductal glandular (células epiteliales) propiamente. De estos compartimentos histológicos glandulares se identificaron los tipos celulares epiteliales: basales y secretoras; y células estromales: células musculares lisas y fibroblastos, y la forma y la ubicación de cada tipo celular, esto con la finalidad de compararla con las muestras procesadas por TUNEL para la identificación de apoptosis. También se definió el tipo de revestimiento epitelial y la presencia de vasos sanguíneos, de estos últimos, se realizó un conteo de la presencia de figuras vasculares en sección transversal para cada una de las etapas estudiadas y se

realizó una comparación como una manera de determinar la existencia de cambios en el desarrollo de la vasculatura glandular entre las etapas del ciclo de las glándulas sexuales.

8.3. Detección y cuantificación de apoptosis

Las dos secciones histológicas restantes que no se tiñeron con H-E (cortes 2 y 4) se utilizaron para la detección y cuantificación de los tipos celulares con presencia de apoptosis, y a partir de esta información, calcular el índice de apoptosis. Se consideró la misma distribución de secciones de tejido que en la técnica histológica (sección 7.2) con la finalidad de poder realizar una comparación entre las características histológicas con la ubicación de las marcas fluorescentes que resultan del tratamiento de los tejidos mediante la técnica de TUNEL y con ello, lograr identificar tipos celulares que mueren por apoptosis. Las secciones de tejido fueron desparafinadas con xilol, rehidratados con soluciones de concentraciones descendentes de etanol, postfijados con paraformaldehído al 4% y permeabilizados con proteinasa K (20 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente y procesados mediante la técnica de TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labeling, por sus siglas en inglés), para lo cual se utilizó el Kit de Thermo Fisher (Click-iT™ Plus TUNEL Assay for In Situ Apoptosis Detection, Alexa Fluor™ 488 dye) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esta técnica está implementada para detectar fragmentos de entre 180 a 200 bp de ADN que han sido producidos por la acción de endonucleasas como parte del proceso de la apoptosis (Elmore, 2007) y, a los que, se les incorporó enzimáticamente, nucleótidos modificados por la presencia del fluorocromo Alexa Fluor 488 (Anexo II) lo que permitió visualizarlos como marcas fluorescentes mediante el uso de microscopía de fluorescencia.

Las secciones de tejido sometidos al método de TUNEL fueron incubados por 60 minutos en cámara húmeda a 37°C con una mezcla de reacción de la enzima TdT y el nucleótido EdUTP. Posteriormente, se agregó la solución con el fluorocromo, dejando las secciones de tejido por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Los tejidos fueron lavados con PBS y recubiertos con glicerol en PBS. Cada ensayo de reacción TUNEL incluyó un control positivo el cual consistió en un corte

histológico tratado con 100 µl de DNAsa I para provocar la fragmentación del ADN (Elmore, 2007), y un control negativo, para lo cual, se utilizó otra sección de tejido diferente, y este fue procesado por el método de TUNEL pero incompleto, al excluir la enzima TdT de la mezcla de reacción mencionada anteriormente. Con la finalidad de tener certidumbre de que las marcas fluorescentes observadas correspondían precisamente a alguna célula en apoptosis, se empleó el colorante fluorescente Hoechst como contraste, ya que este tiñe el núcleo celular.

Las secciones de tejido procesadas por TUNEL fueron observadas y fotografiadas en un microscopio confocal láser de barrido Zeiss 510, utilizando la herramienta de epifluorescencia y con el programa ZEN 2010 B, con la longitud de onda de excitación de 488 nm para revelar las marcas fluorescentes. Estas marcas fueron consideradas como una célula TUNE (+) indicativa de apoptosis. Para obtener los datos correspondientes a los tipos de células que presentan apoptosis y, el índice de apoptosis para cada órgano, se consideró la misma regionalización de las glándulas como se describió en la sección 7.2 que corresponde al estudio histológico de las glándulas). Para realizar los conteos celulares, primeramente, se midió el área de cada glándula completa presente en cada corte histológico, así como el área de las fotomicrografías obtenidas, todo ello con el programa Image J y el área de cada corte fue calculada con el programa AxioVision SE64 Rel. 4.9.1. De cada fotomicrografía se obtuvo en total de células marcadas con Hoechst y el total de células TUNEL (+). Posteriormente, se calculó el total de células en los tejidos y el total de células TUNEL (+) por unidad de área de tejido (mm²).

Debido a que los órganos cambian de tamaño entre las diferentes etapas que conforman el ciclo de las glándulas sexuales accesorias, se realizó una estandarización consistente en determinar el número de células existentes por mm² de tejido con la finalidad de poder realizar comparaciones directas de los datos entre las diferentes etapas de estudio. La estandarización mencionada se hizo de la siguiente manera:

- No. Total de células por mm² de tejido glandular= no. total de células/área total del corte histológico (mm²).

- No. Total de células en apoptosis por mm^2 de tejido glandular = no. total de células TUNEL (+)/área total del corte histológico (mm^2).
- No. Total de cada tipo celular por mm^2 de tejido glandular = no. total de cada tipo celular/área total del corte histológico (mm^2).

El índice apoptótico fue obtenido con base en la forma establecida por Wang *et al.*, (2006), en la que se considera el número de células apoptóticas (TUNEL+) y el número total de células determinado a partir del conteo de núcleos celulares teñidos con Hoechst para cada una de las fotomicrografías obtenidas, empleando la siguiente fórmula:

$$(\text{No. Total de células TUNEL (+) / No. Total de células teñidas con Hoechst}) \times 100.$$

8.4. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos consistió en la comparación de los valores obtenidos para cada una de las variables de estudio (el número total de células, el número total de células en apoptosis y el número total de cada tipo celular, por mm^2 de tejido glandular) entre las etapas del ciclo de las glándulas sexuales accesorias consideradas, mediante la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba *post hoc* de Dunn's. Para determinar la normalidad de los datos de los diferentes grupos de estudio se realizó una prueba de Shapiro Wilks. La comparación de los datos correspondientes al número de células de los diferentes tipos celulares registrados entre las etapas de máximo tamaño e involución para los diferentes órganos de estudio se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de U de Mann-Whitney para dos muestras. Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa GraphPad Prism versión 8.0.

Los resultados de los tipos celulares se expresan como la media $\pm$ una Desviación Estándar (DE). Para todas las variables las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1. Análisis histológico

9.1.1. Glándulas ampulares

La etapa de inactividad correspondiente al mes de mayo, las glándulas ampulares presentaron adenómeros tubulares con revestimiento de epitelio pseudoestratificado cúbico y fue notoria la presencia de células basales y secretoras. Las células basales se encontraban en la base del adenómero, por debajo de las células secretoras, y fueron distinguibles por su núcleo plano; mientras que células secretorias contenían un núcleo parabasal de forma redonda (Figura 7A). En el estroma se observó presencia de músculo liso, con células identificables por sus núcleos alargados, algunas se encontraban adosadas a la superficie basal de las células epiteliales de los adenómeros (Figura 7A). Los adenómeros mostraron ausencia de secreción en la luz (Figuras 7 y 8 A1-A3). La capsula que rodeaba a la glándula ampular presentaba músculo liso (Figura 8 A2).

Durante el reinicio del crecimiento (agosto), las glándulas ampulares presentaron adenómeros de forma tubular, con revestimiento epitelial de tipo pseudoestratificado cúbico a cilíndrico en algunos adenómeros, con presencia de células basales y secretoras. En el compartimento intersticial (estroma) de los adenómeros se presentaron algunas células musculares lisas que, como en la etapa anterior, estas se encontraban adosadas a la lámina basal del epitelio, y mostraban un aspecto alargado (Figura 7B). La luz de los adenómeros también se caracterizó por la ausencia de secreción. La capsula que rodeaba a la glándula ampular presentaba músculo liso y se observaba de un grosor mayor a la etapa anterior (Figura 8 B1).

Las glándulas ampulares en la etapa de máximo tamaño presentaron adenómeros de arquitectura alveolar, con diámetro mayor a diferencia de las otras etapas del ciclo consideradas en este estudio, con revestimiento de epitelio pseudoestratificado de cúbico a cilíndrico, este último mostró citoplasma supranuclear ligeramente acidófilo, característico de las células con actividad secretora (Figura 7C). La luz de los adenómeros presentó secreción acidófila intensa y fuertemente floculada centralmente, en tanto que, en algunos adenómeros, las secreciones se observaron excéntricamente en proceso de exocitosis merocrina (Figuras 7C y 8 C2). La

cápsula que recubría la glándula ampular se encontraba compuesta por músculo liso (Figura 8 C1), y se observaron núcleos alargados pertenecientes a las células musculares adosadas estas a los adenómeros glandulares (Figura 7C). Se reconocieron algunos vasos sanguíneos en el intersticio (estroma glandular), mientras que en el estroma de los adenómeros se pudieron observar gran cantidad de vasos sanguíneos (Figura 8 C1-C3).

En la etapa de involución, las glándulas ampulares presentaron adenómeros alveolares, con revestimiento de epitelio pseudoestratificado cúbico, con los núcleos ubicados a diferentes alturas (Figura 7D). En el espacio intersticial que rodeaba a los adenómeros se observaron algunas células musculares lisas adosadas a la lámina basal del epitelio (Figura 7D). El lumen de los adenómeros no presentó evidencias de secreción. Seguido de las células musculares, se encontró una capa gruesa de tejido conectivo con algunos fibroblastos (Figura 7D). Los adenómeros presentaron un diámetro menor a la etapa de máximo crecimiento, típico del periodo de involución (enero) (Figura 8 D1-D3).

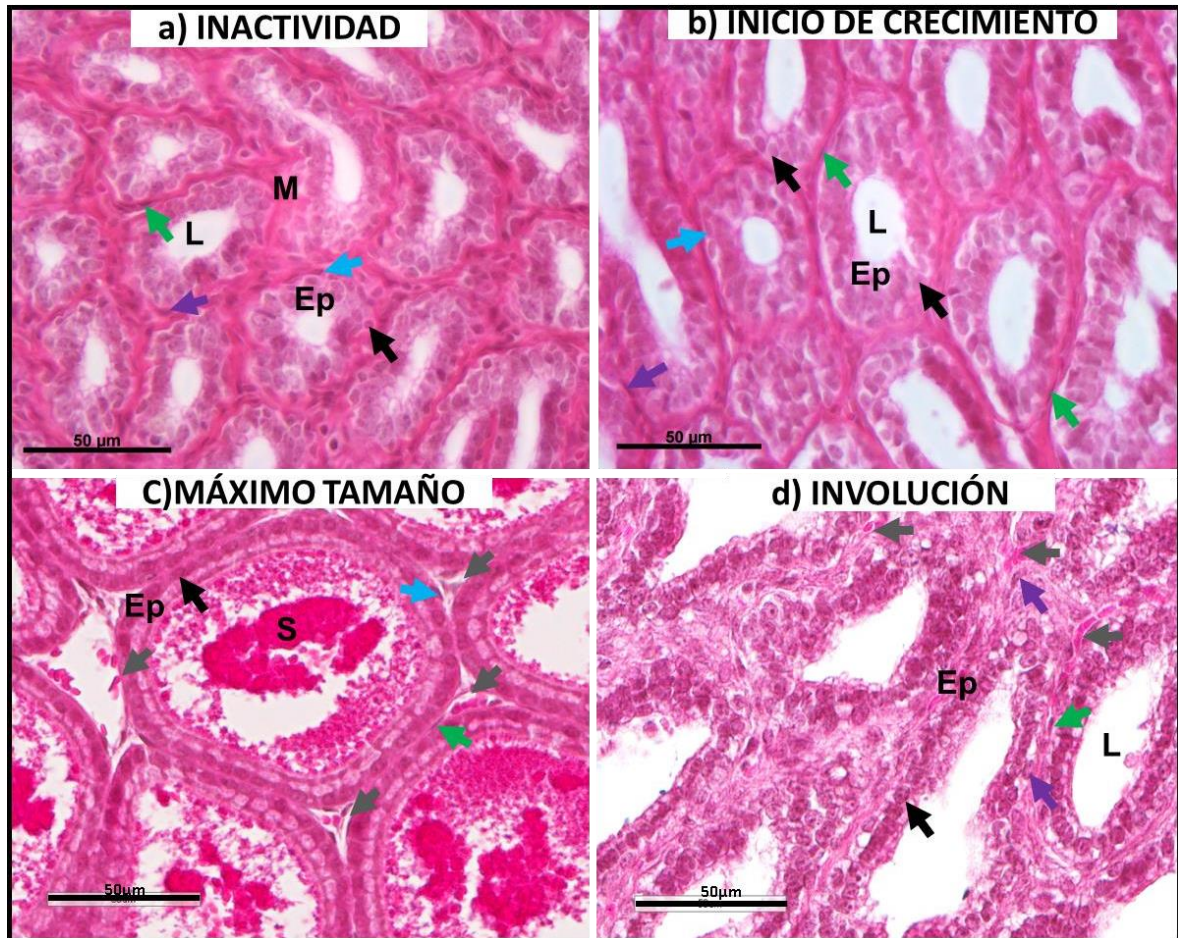


Figura 7. Fotomicrografías de secciones histológicas representativas de las glándulas ampulares de *Corynorhinus mexicanus* en las etapas de: A. Inactividad (mayo); B. Inicio de crecimiento (agosto); C. Máximo tamaño (noviembre); D. Involución (enero). M, músculo; Ep, epitelio; TC, tejido conectivo; L, lumen; Flecha verde, célula muscular; Flecha azul, célula basal; Flecha morada, fibroblasto; Flecha negra, célula secretora, Flecha gris, vaso sanguíneo (H-E. X400)

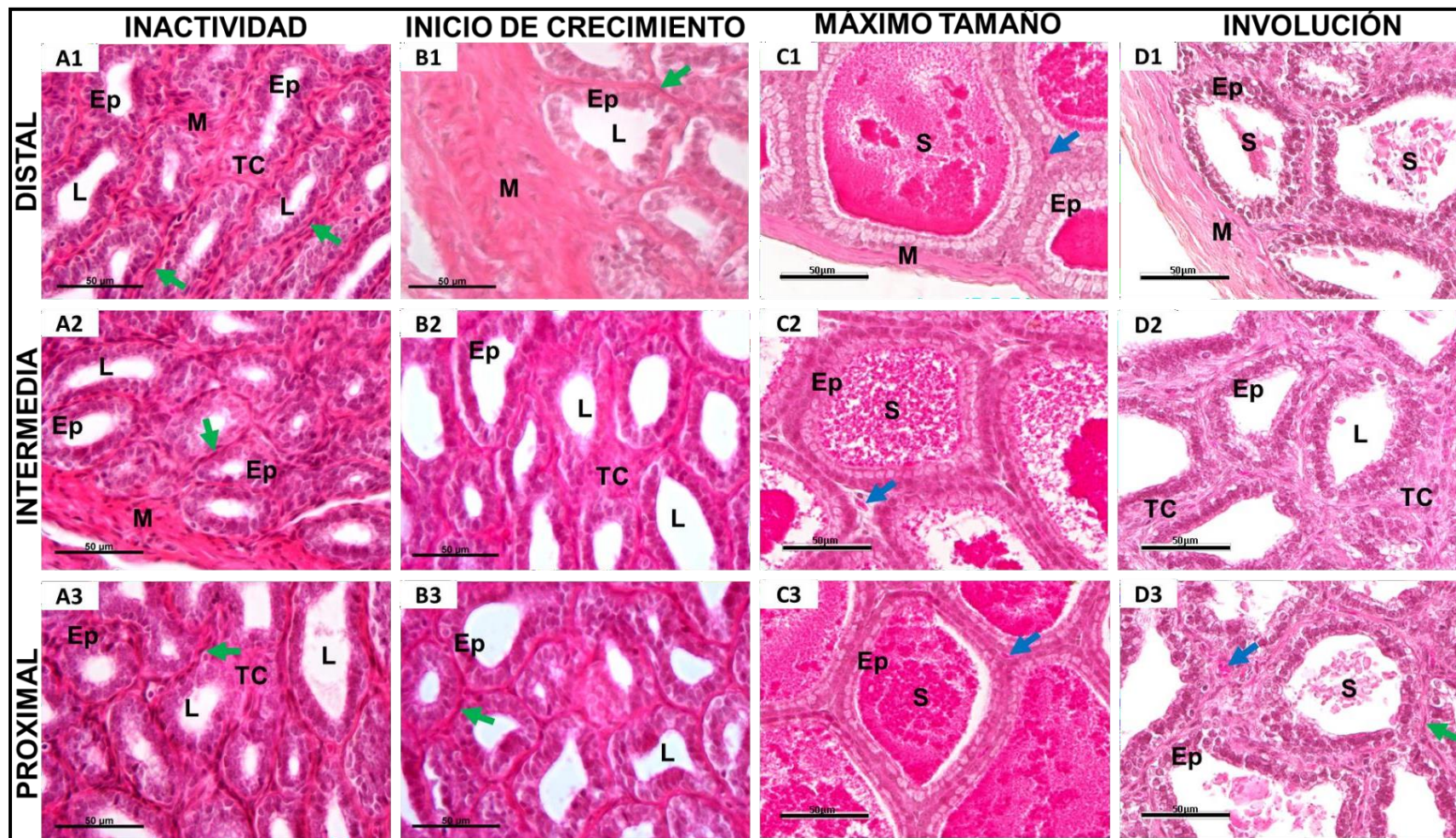


Figura 8. Fotomicrografías de secciones histológicas representativas de las tres zonas anatómicas en las que se regionalizaron las glándulas ampulares de *Corynorhinus mexicanus*, y sus variaciones en las etapas de: A1-A3, Inactividad (mayo); B1-B3, Inicio de crecimiento (agosto); C1-C3, máximo tamaño (noviembre); D1-D3, Involución (enero); M, músculo; Ep, epitelio; TC, tejido conectivo; L, lumen; Flechas verdes, núcleos de células musculares; Flechas azules, vasos sanguíneos. (H-E. X400)

9.1.2. Próstata (lóbulos ventral y dorsal)

Una vez realizado el análisis histológico, no se observaron diferencias entre los lóbulos ventral y dorsal (Figuras 10 y 11), por lo que se tomó la decisión de realizar la descripción histológica considerando a ambos lóbulos por igual.

Durante la etapa de inactividad, la próstata mostró características interesantes. Se presentaron algunos adenómeros con arquitectura tubular cuyo revestimiento epitelial mostró carácter pseudoestratificado cúbico, con la presencia de células secretoras con núcleo redondos y células basales con núcleos alargados ubicadas debajo de las secretoras. Rodeando a cada adenómero se encontraban las células musculares lisas (Figura 9A). Estos adenómeros estaban embebidos en capas gruesas de tejido conectivo y músculo liso, como parte del estroma. El diámetro de los adenómeros se presentó de tamaño pequeño (Figuras 10 A1-A3 y 11 A1-A3).

En la etapa de inicio de crecimiento, la próstata de *C. mexicanus* presentó adenómeros de diámetro menor comparativamente con el diámetro en las otras etapas del ciclo analizadas. En cuanto a la arquitectura, los adenómeros se observaron tubulares, con un revestimiento de epitelio simple cúbico con células basales y secretoras (Figura 9B). La luz de los adenómeros no mostró evidencias de secreciones. Tanto el tejido conectivo como el músculo liso separaban a grupos de adenómeros (Figuras 10 B1-B3 y 11 B1-B3). En la cápsula del órgano se observaron vasos sanguíneos (Figura 10 B1).

En la etapa de máximo tamaño, la próstata presentó algunos adenómeros con revestimiento de epitelio simple cúbico con células basales y secretoras, mientras que otros mostraron un epitelio atípico debido a la ausencia de células epiteliales secretoras en algunas regiones (Figura 9 C), además de presentar en la región apical de las células, secreción merocrina, mientras que otras zonas lo presentaron apocrino. En la luz de los adenómeros se observó secreción ligeramente basófila con floculación leve de material vesiculado dimensionalmente heterogéneo (Figuras 9 C, 10 C1-C3 y 11 C1-C3). Algunas células musculares se disponían adosadas a la superficie basal de las células epiteliales de los adenómeros en su porción interna. En el intersticio de los adenómeros tanto del lóbulo prostático ventral como del dorsal se observaron pequeños vasos sanguíneos (Figuras 10 B2 y 11 C2).

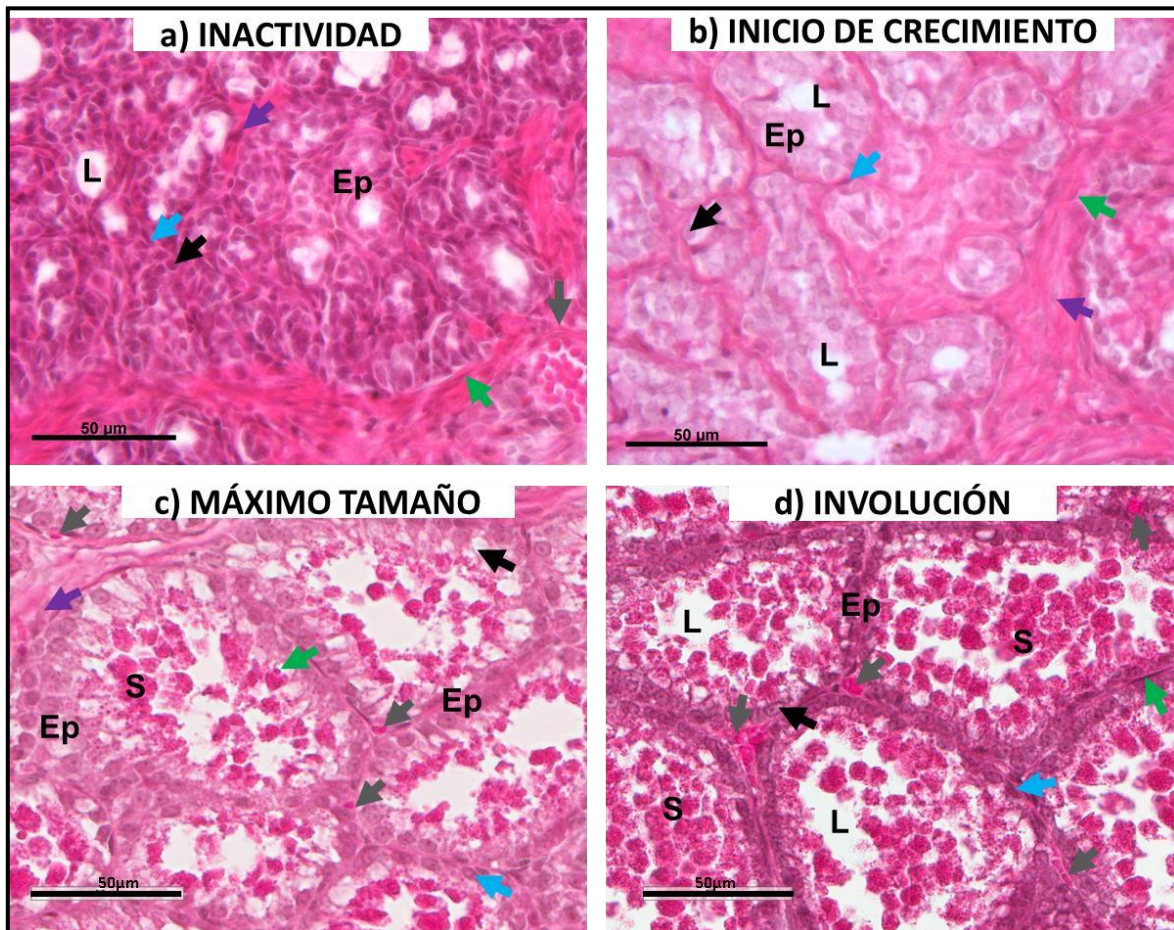


Figura 9. Fotomicrografías de secciones histológicas de la próstata de murciélagos *Corynorhinus mexicanus* en las etapas de: A, Inactividad (mayo). B, Inicio de crecimiento (agosto). C, Máximo tamaño (noviembre). D, Involución (enero). M, músculo; Ep, epitelio; TC, tejido conectivo; L, lumen; Flecha verde, célula muscular; Flecha azul, célula basal; Flecha morada, fibroblasto; Flecha negra, célula secretora, Flecha gris, vaso sanguíneo (H-E. X400).

En la etapa de involución los adenómeros presentan un revestimiento de epitelio cúbico simple, mientras en otros adenómeros se pudo observar un epitelio atípico; la superficie apical del epitelio muestra regiones con mecanismo de secreción apocrino. En la luz de los adenómeros se presentó secreción intensamente acidófila con floculación alta de material vesiculado dimensionalmente homogéneo en algunos adenómeros y en otros ligeramente heterogéneo (Figuras 10 D1-D3 y 11 D3). Se muestran escasas células musculares, algunas se disponen adosadas a la superficie basal de las células epiteliales de los adenómeros en su porción interna. en el intersticio de los adenómeros se pudo observar la presencia de algunos vasos sanguíneos (Figuras 9 D, 10 D3 y 11 D2 y D3).

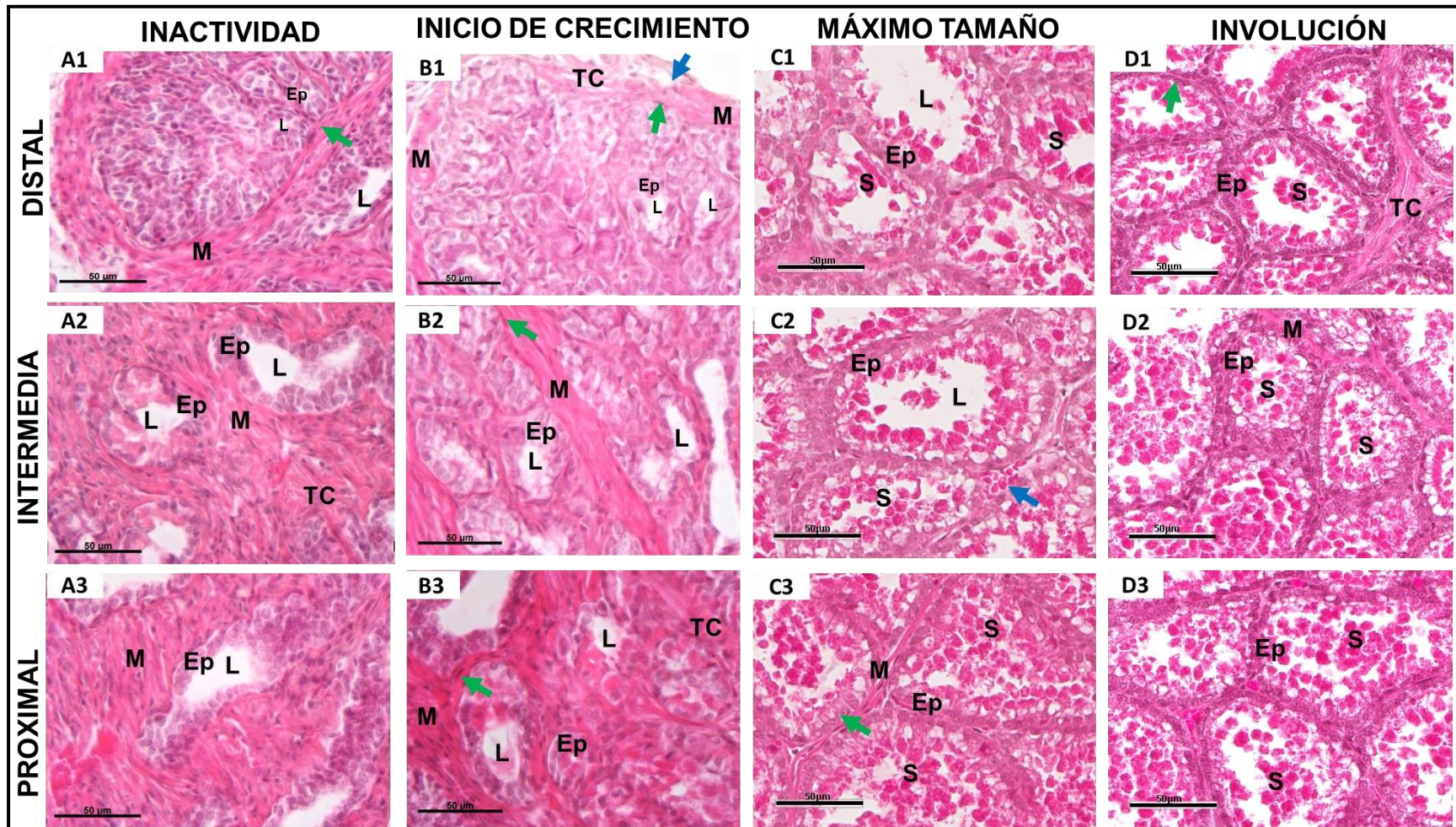


Figura 10. Fotomicrografías de secciones histológicas obtenidas de las tres zonas anatómicas en las que se regionalizó el lóbulo ventral de la próstata de *Corynorhinus mexicanus*, en las etapas de: A1-A3, Inactividad (mayo). B1-B3, Inicio de crecimiento (agosto). C1-C3, Máximo tamaño (noviembre). D1-D3. Involución (enero). M, músculo; Ep, epitelio; TC, tejido conectivo; L, lumen; flechas verdes: núcleos de células musculares; flechas azules, vasos sanguíneos (H-E. X400).

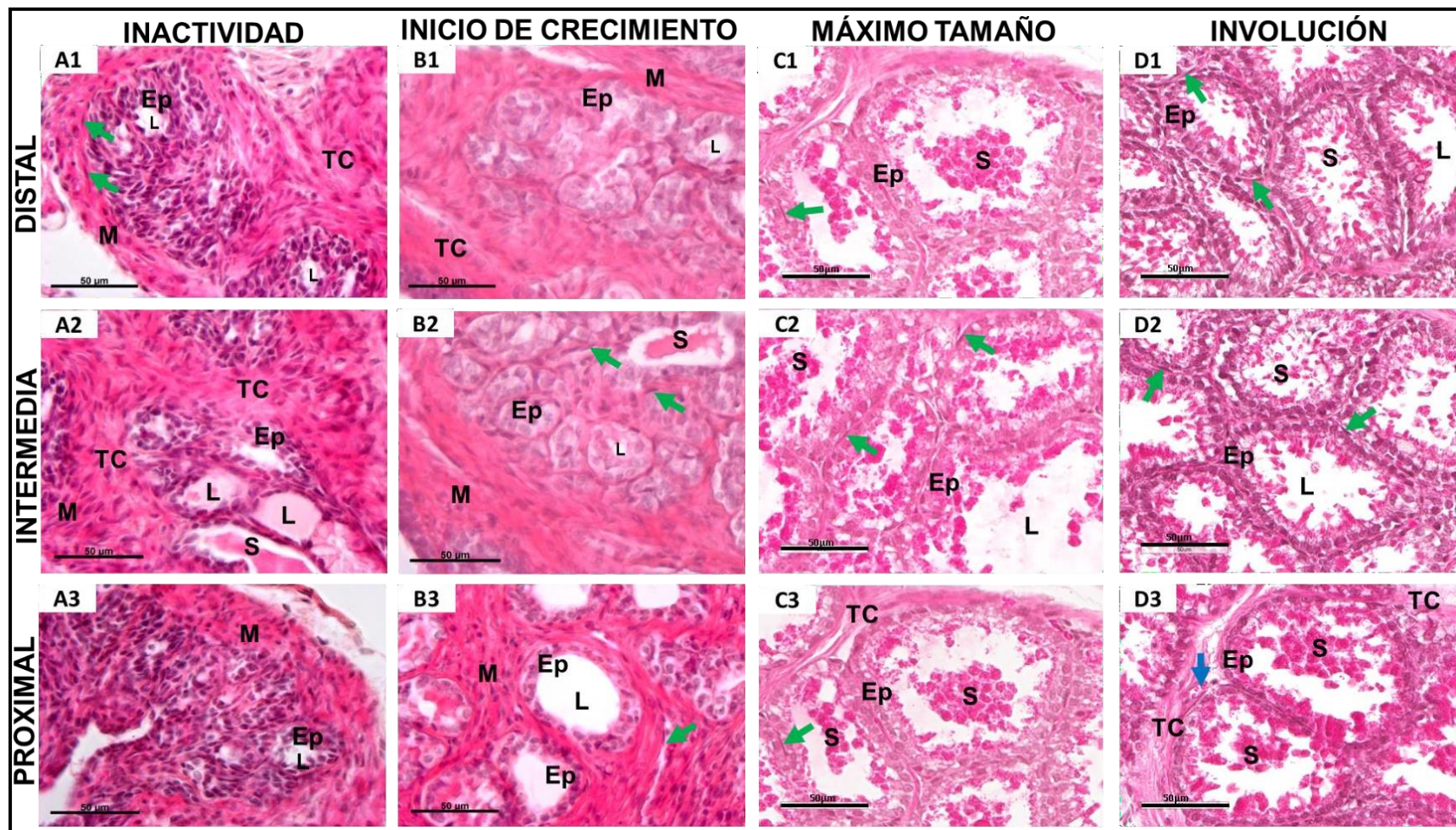


Figura 11. Fotomicrografías de secciones histológicas obtenidas de las tres zonas anatómicas en las que se regionalizó el lóbulo dorsal de *Corynorhinus mexicanus*, en las etapas de: A1-A3, Inactividad (mayo). B1-B3, Inicio de crecimiento (agosto). C1-C3, Máximo tamaño (noviembre). D1-D3, Involución (enero). Los números corresponden a las diferentes zonas de cada órgano: 1. Proximal; 2. Intermedia; 3. Distal. M, músculo; Ep, epitelio; TC, tejido conectivo; L, lumen; flechas verdes: núcleos de células musculares; flechas azules, vasos sanguíneos (H-E. X400).

9.1.3. Presencia de vasos sanguíneos

Un análisis en el número de vasos sanguíneos se realizó de forma comparativa entre el mismo órgano o lóbulos prostáticos estudiados en las diferentes etapas del ciclo de las glándulas sexuales accesorias de la especie de estudio.

Tanto la glándula ampular como la próstata en sus dos lóbulos (ventral y dorsal) mostraron valores muy bajos en el número de vasos en la etapa de inactividad e inicio de crecimiento comparadas con las etapas de máximo tamaño e involución (Figura 12).

Como se puede apreciar en la figura 12, la glándula ampular no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la etapa de inactividad e inicio de crecimiento, pero sí se presentaron diferencias cuando se comparó con las últimas dos etapas, indicando un aumento en la presencia en el número de figuras que representan vasos sanguíneos. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellas, indicando que este incremento se mantuvo.

Por otra parte, la próstata en sus lóbulos ventral y dorsal mostró un comportamiento muy similar en cuanto a la presencia de vasos sanguíneos en las diferentes etapas, siendo muy bajo en la etapa de inactividad y presentando un aumento estadísticamente significativo en comparación con la etapa de inicio de crecimiento. Posteriormente, la etapa que presentó el mayor número de vasos fue la de máximo tamaño en comparación con las primeras dos etapas del ciclo de las glándulas estudiadas.

Aunque el número de vasos sanguíneos presentes (contados a partir de las figuras en corte transversal de los vasos) en los lóbulos prostáticos ventral y dorsal los fue similar en las etapas de inactividad, inicio de crecimiento y máximo tamaño, la presencia de vasos sanguíneos fue diferente en la etapa de involución. La comparación de la presencia de vasos en las etapas de máximo tamaño e involución, no mostró diferencias estadísticamente significativas, pero sí mostró diferencias cuando se comparó con las dos primeras etapas, presentando valores mucho más bajos. En el lóbulo dorsal, se observó que el aumento de vasos no mostró diferencias significativas en las etapas de máximo tamaño e inicio de crecimiento, pero sí hubo diferencias cuando se comparó con la etapa de inactividad, ya que la

presencia de vasos era mínima. Cuando se comparó esta última etapa con el inicio de crecimiento mostró que no existen diferencias entre ellas (Figura 12).

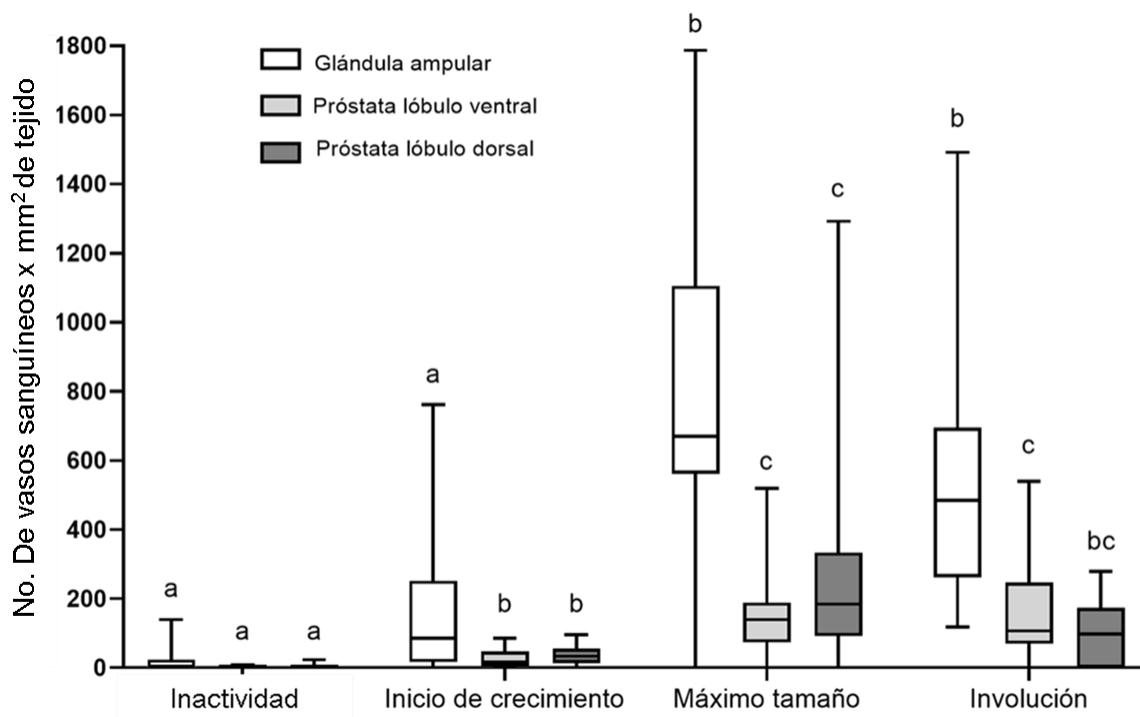


Figura 12. Variación en el número de vasos sanguíneos presentes por unidad de área (mm^2) en la glándula ampular y en la próstata en sus dos regiones, ventral y dorsal, en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *Corynorhinus mexicanus*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para el número de vasos del mismo órgano o lóbulo al comparar entre las diferentes etapas del ciclo analizadas (Kruskal Wallis, Dunn's test *post hoc* $p \leq 0.05$)

9.2. Detección y cuantificación de apoptosis

9.2.1. Número total de células

Se realizó un conteo del total de células por corte histológico y por unidad de área (1 mm^2) sin distinguir por tipo celular. Por corte histológico, la glándula ampular mostró valores más altos en el número total de células en comparación con los lóbulos prostáticos en todas las etapas (Figura 13 A). En la etapa de inactividad se presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la etapa de inicio de crecimiento, lo que indica que, el número de células aumentó en esta última etapa presentando los valores más altos con respecto a las demás etapas.

Posteriormente, en la etapa de máximo tamaño se mantuvo el número de células, ya que no se presentaron diferencias significativas con respecto a las etapas de inactividad, inicio de crecimiento e involución (Figura 13 A).

La próstata en sus lóbulos ventral y dorsal, mostró el mismo comportamiento con respecto al número total de células, presentando valores bajos en las dos primeras etapas (inactividad e inicio de crecimiento), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas; por otro lado, las siguientes etapas (máximo tamaño e involución), presentaron valores altos en el número total de células, sin mostrar diferencias estadísticamente entre ellas, pero sí con respecto a las dos primeras etapas (Figura 13 A).

Cuando el análisis se realizó para el número de células por mm^2 de tejido, se observó un resultado muy diferente al registrado por corte histológico (Figura 13 B). Tanto la glándula ampular como la próstata en sus lóbulos ventral y dorsal presentan valores altos en el número de células por mm^2 en las dos primeras etapas (inactividad e inicio de crecimiento), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas; mientras que, para las siguientes etapas (máximo tamaño e involución), se presentaron valores más bajos en el número total de células por mm^2 , sin mostrar diferencias estadísticamente entre ellas pero sí con respecto a las dos primeras etapas del ciclo de las glándulas sexuales accesorias (Figura 13 B).

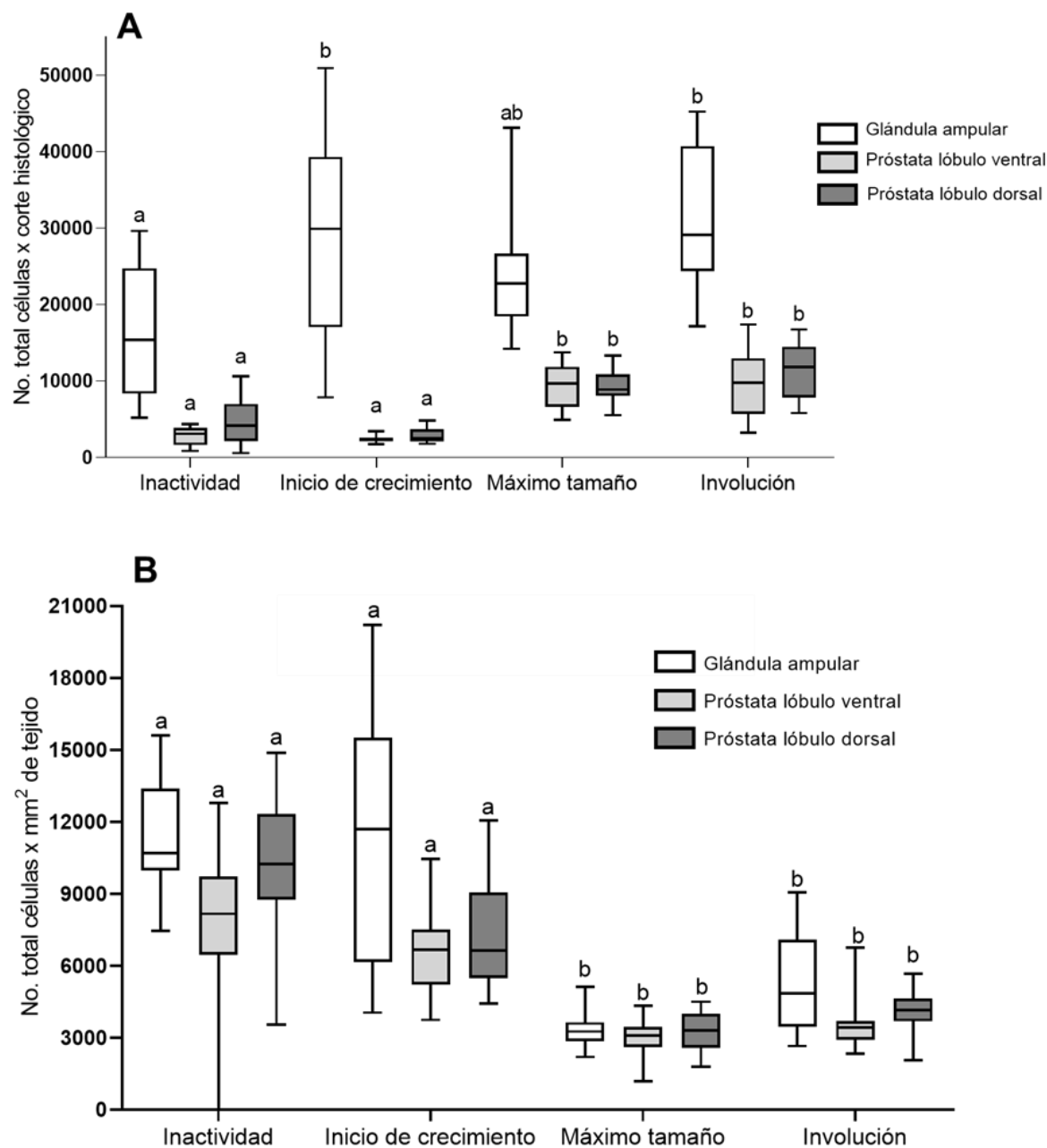


Figura 13. Variación en el número total de células registradas a partir de las secciones histológicas de las glándulas ampulares y de la próstata, en sus lóbulos ventral y dorsal en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *Corynorhinus mexicanus*. A. Total de células por corte histológico; B. Total de células por unidad de área (mm²). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para el número total de células del mismo órgano o lóbulo al comparar entre las diferentes etapas (Kruskal Wallis, Dunn's test *post hoc*, $p \leq 0.05$)

9.2.2. Número total de células apoptóticas

Se registró para la glándula ampular que se mantuvieron valores altos en cuanto al número total de células TUNEL (+), indicativas de apoptosis, y que este valor fue aumentando desde la etapa de inactividad para mostrar los valores más altos en la etapa de involución. Sin embargo, para esta glándula, no había diferencias estadísticamente significativas en las etapas analizadas (Figura 14 B).

En el caso de los lóbulos de la próstata, los valores del número de células apoptóticas por corte histológico fueron bajos en las dos primeras etapas (involución e inicio de crecimiento), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre las dos etapas; por otro lado, las siguientes etapas (máximo tamaño e involución), presentaron valores más altos en el número total de células apoptóticas, sin mostrar diferencias estadísticamente entre ellas pero sí con respecto a las dos primeras etapas (Figura 14 B).

El estudio realizado en el número total de células apoptóticas por mm² de tejido indicó un comportamiento diferente al que se encontró por corte histológico (Figura 14 B). Tanto la glándula ampular como la próstata, ésta última en sus lóbulos ventral y dorsal, presentaron valores altos en el número total de células apoptóticas por mm² en las dos primeras etapas (involución e inicio de crecimiento), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas; por otro lado, las siguientes etapas (máximo tamaño e involución), presentaron valores más bajos en el número total de células por mm², sin mostrar diferencias estadísticamente entre ellas pero sí con respecto a las dos primeras etapas (Figura 14 B).

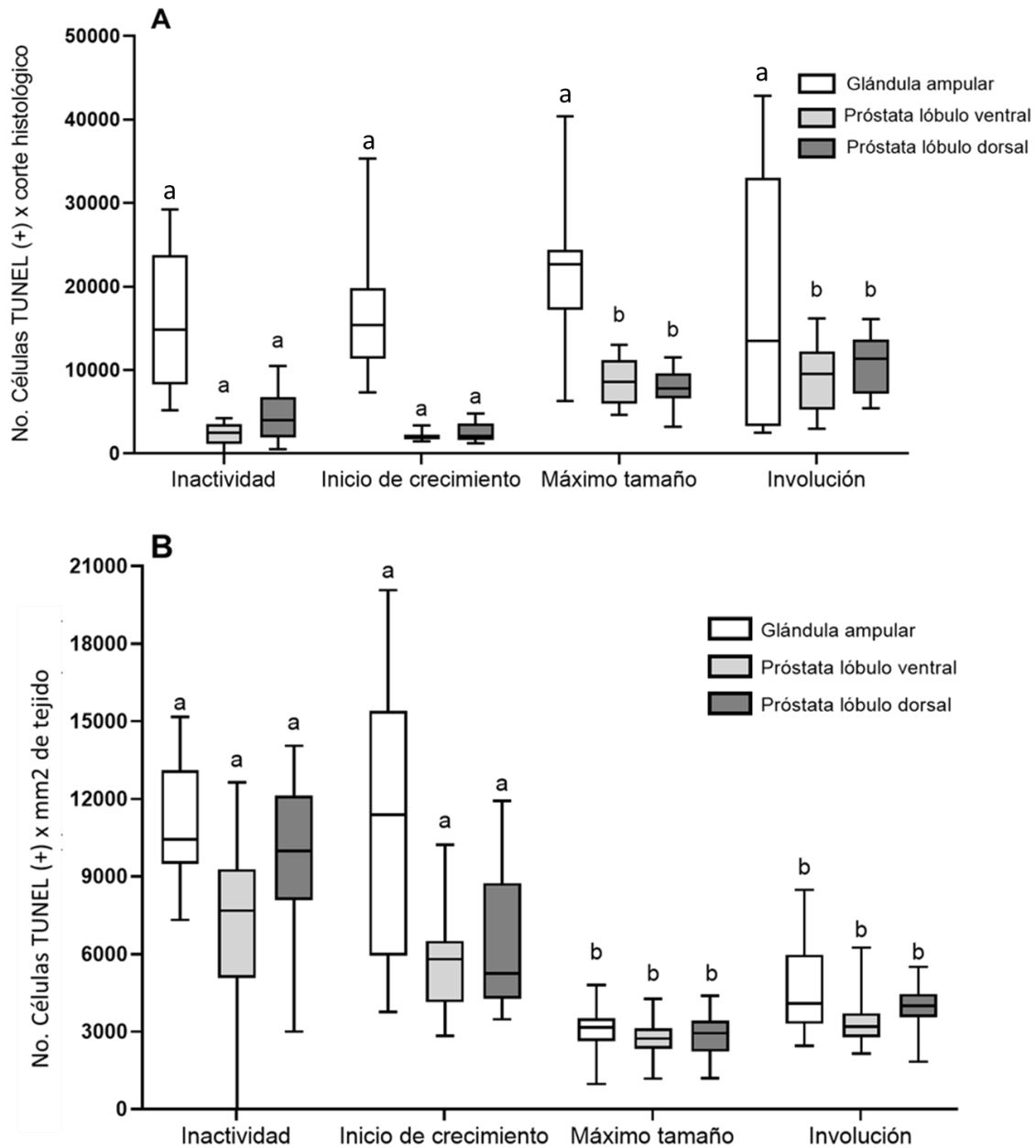


Figura 14. Variación en el número total de células apoptóticas en las glándulas ampulares y en la próstata, en sus lóbulos ventral y dorsal en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *Corynorhinus mexicanus*. A, Total de células apoptóticas por corte histológico. B, Total de células apoptóticas por unidad de área (1 mm²). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para el número total de células del mismo órgano o lóbulo entre las diferentes etapas (Kruskal Wallis, Dunn's test *post hoc*, $p \leq 0.05$)

Cuando se calculó el índice apoptótico para cada una de las diferentes etapas del ciclo de las glándulas sexuales accesorias tanto de las glándulas ampulares como

de la próstata en sus dos diferentes lóbulos (ventral y dorsal), y se compararon los valores, no se registraron diferencias estadísticamente significativas, presentándose en general, índices muy altos, desde un 84% hasta un 96% (Figura 15).

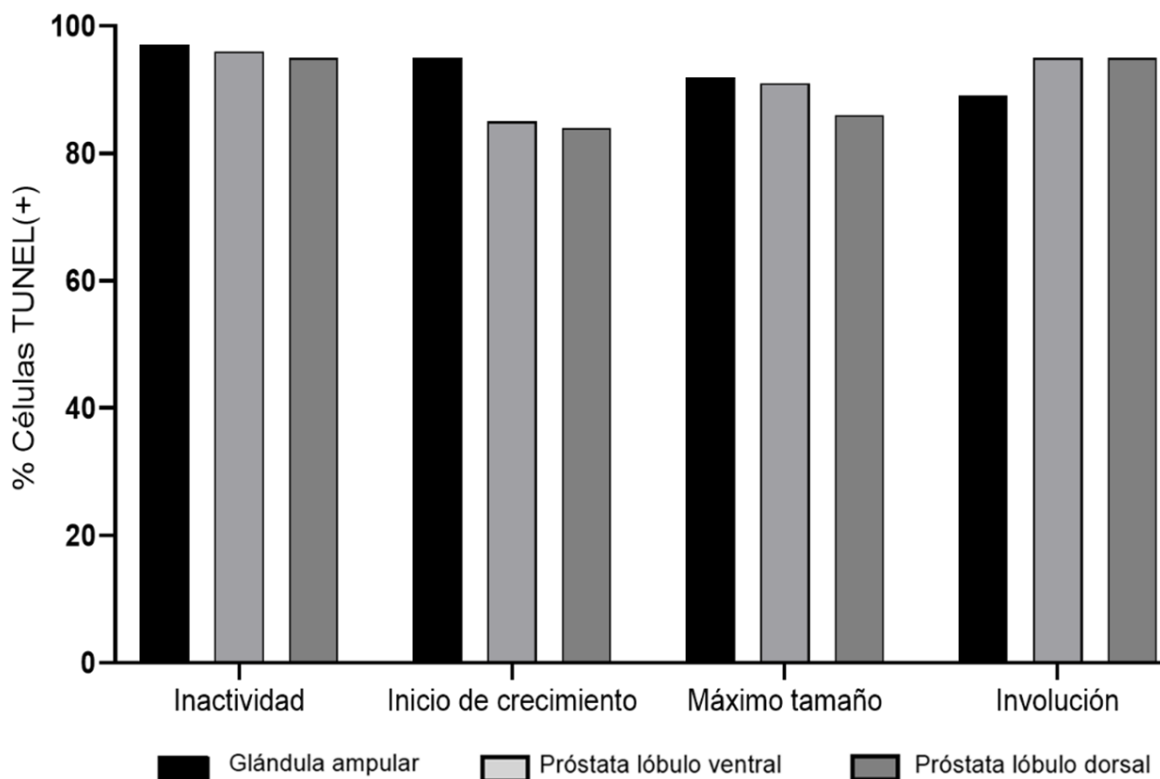


Figura 15. Variación en el valor promedio para el índice apoptótico (IA), considerado como el porcentaje de células TUNEL (+) en la glándula ampular y en la próstata, en sus diferentes lóbulos, ventral y dorsal, en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *Corynorhinus mexicanus*.

9.2.3. Número de células con evidencia de apoptosis por tipos celulares

Para reconocer la presencia e identificar los diferentes tipos celulares que presentaron evidencias de apoptosis en ambas glándulas sexuales accesorias (próstata y glándula ampular) de los murciélagos *C. mexicanus* estudiados, se tomó en cuenta la forma y la ubicación de los núcleos celulares. En la etapa de inactividad e inicio del crecimiento, únicamente se lograron identificar los dos compartimentos de las glándulas sexuales accesorias, sin embargo, no fue posible identificar los tipos celulares que conforman estos compartimentos (Figuras 16, 17 y 18).

En las etapas posteriores, máximo tamaño e involución, en el epitelio se pudieron identificar dos tipos de células apoptóticas, secretoras y células basales; Las células secretoras epiteliales presentan núcleos redondos y parabasales, son más abundantes y presentan variaciones de tamaño y forma; en tanto que las células basales se encontraban debajo de las células secretoras y podían observarse como células con núcleos alargados, son menos abundantes dentro del epitelio, en comparación con las células secretoras, y se encuentran firmemente adheridas a la membrana basal de cada adenómero (Figuras 16, 17 y 18).

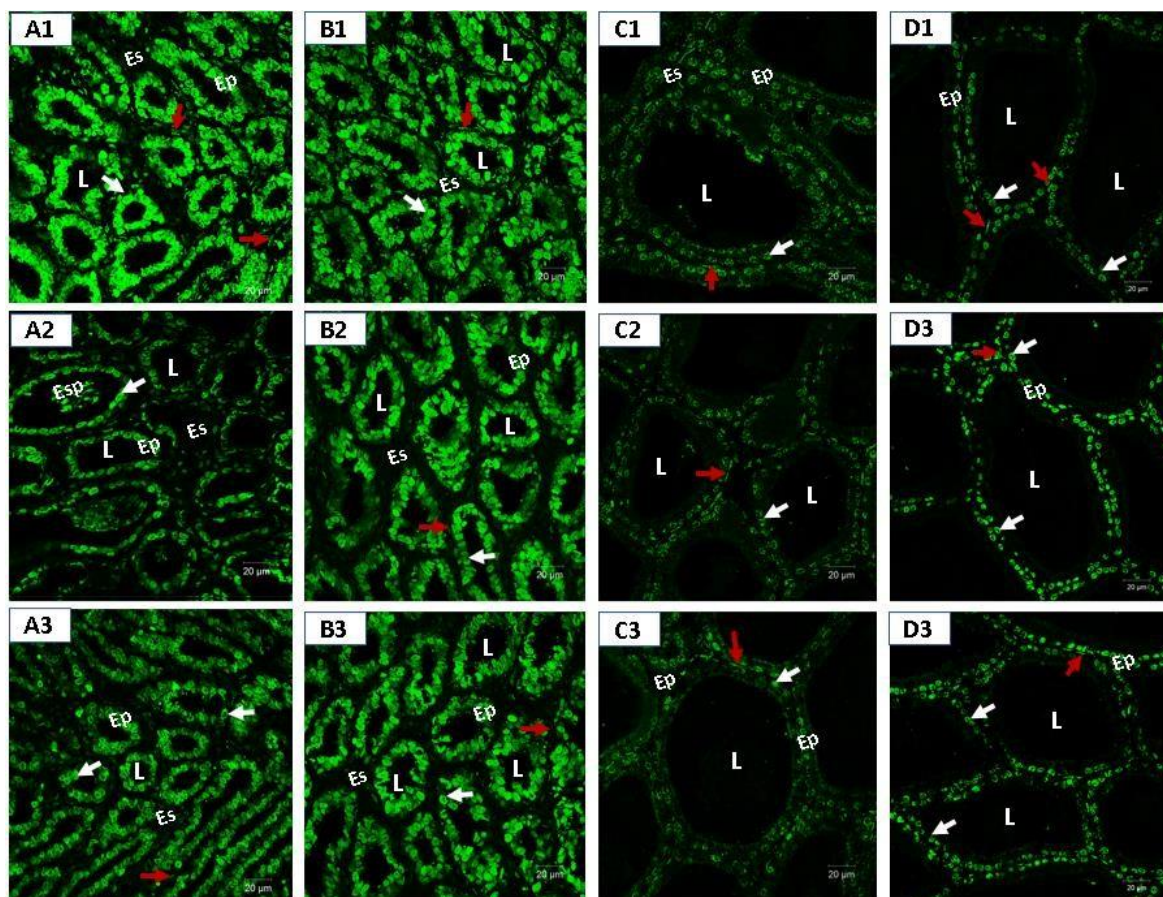


Figura 16. Fotomicrografías por microscopía de epifluorescencia, que muestran evidencias de apoptosis en las glándulas ampulares de *Corynorhinus mexicanus* en la etapa de: A1-A3, Inactividad (mayo). B1-B3, Inicio de crecimiento (agosto). C1-C3, Máximo tamaño (noviembre). D1-D3, Involución (enero). Cada número corresponde a las diferentes zonas de cada órgano: 1. Proximal; 2. Intermedia; 3. Distal. Ep, epitelio; Es, estroma, Esp, espermatozoides; L, lumen; Flecha blanca, núcleos de células epiteliales TUNEL (+); Flecha roja, núcleos de células musculares TUNEL (+). Técnica de TUNEL. X400.

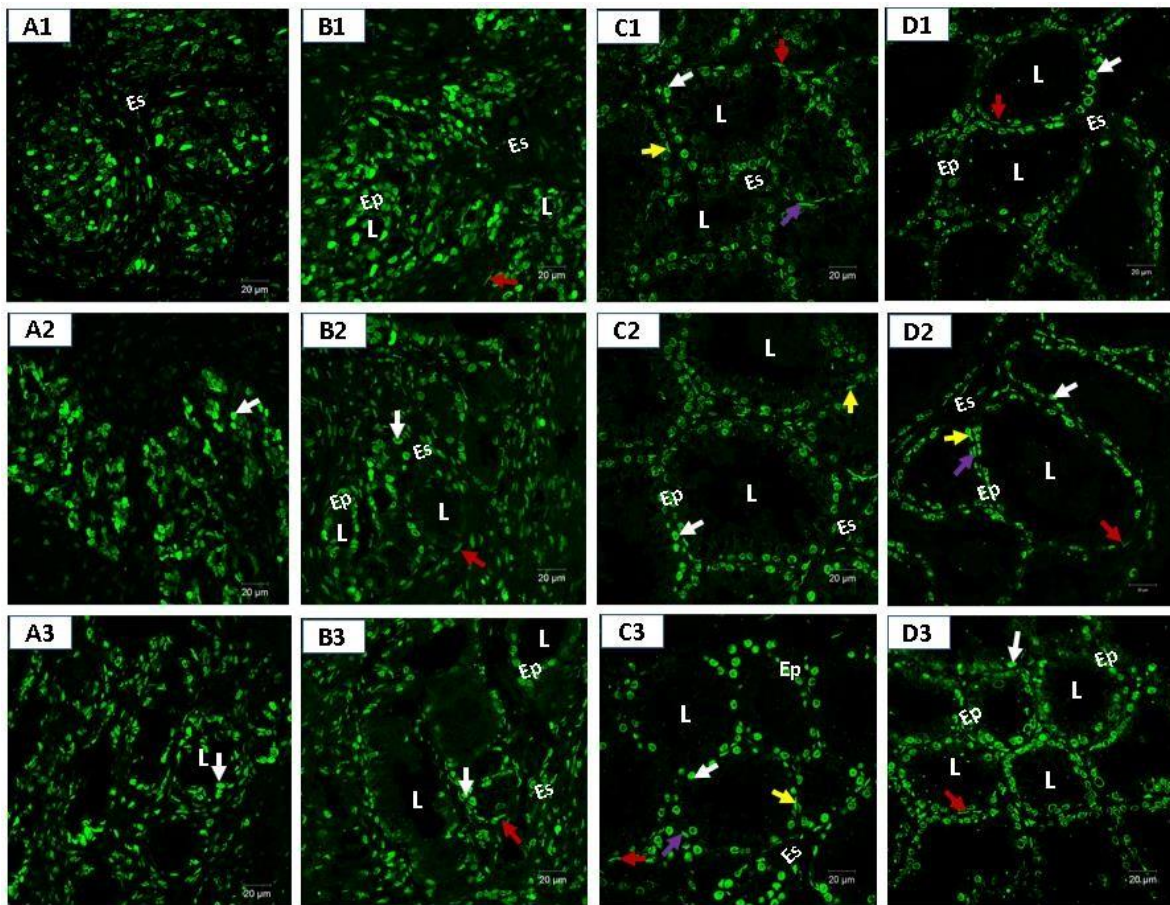


Figura 17. Fotomicrografías por microscopía de epifluorescencia, que muestran evidencias de apoptosis en la próstata ventral de *Corynorhinus mexicanus* en la etapa de: A1-A3, Inactividad (mayo). B1-B3, Inicio de crecimiento (agosto). C1-C3, Máximo tamaño (noviembre). D1-D3, Involución (enero). Cada número corresponde a las diferentes zonas de cada órgano: 1. Proximal; 2. Intermedia; 3.-Distal. Ep, epitelio; Es, estroma, L, lumen; flecha blanca, núcleos de células epiteliales TUNEL (+); Flecha roja, núcleos de células musculares TUNEL (+); Flecha amarilla, núcleos de células basales TUNEL (+); Flecha morada, núcleos de fibroblastos TUNEL (+). Técnica de TUNEL. X400.

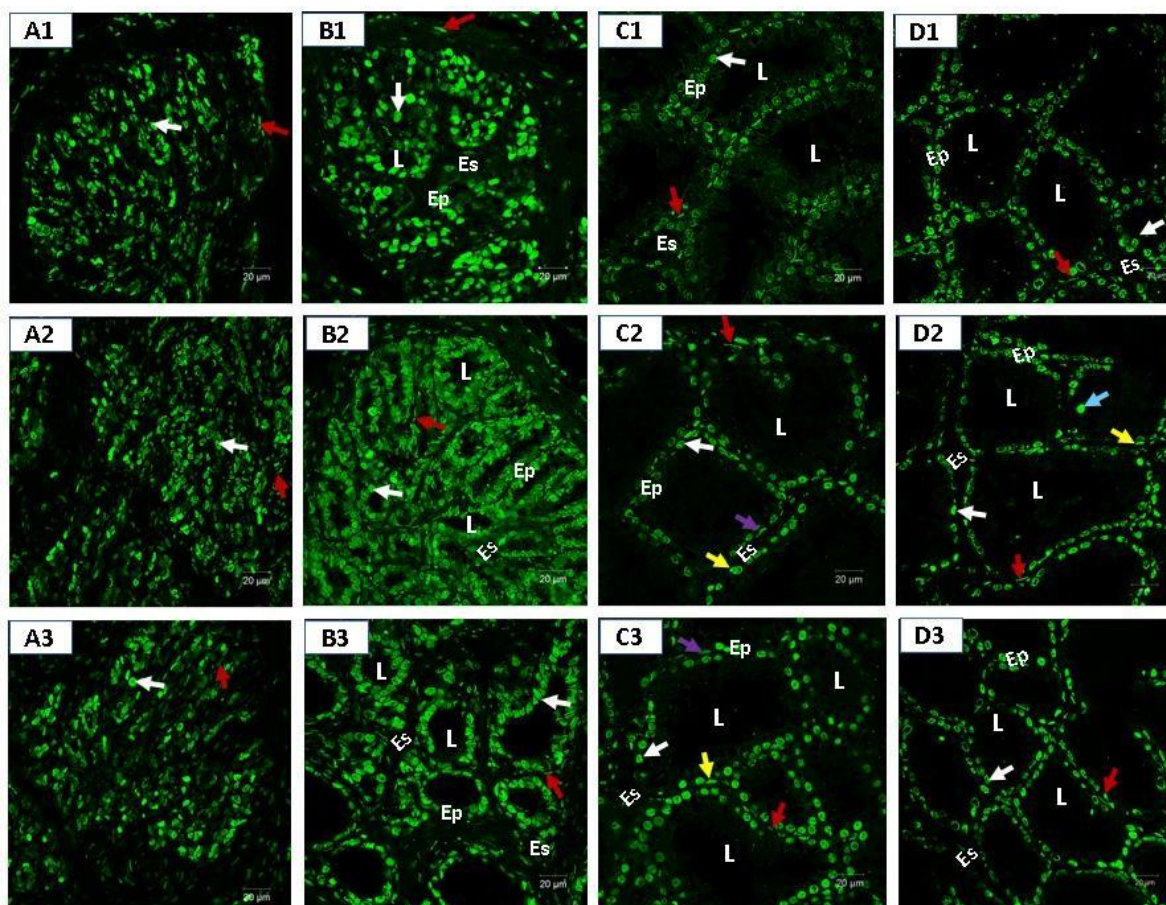


Figura 18. Fotomicrografías por microscopía de epifluorescencia, que muestran evidencias de apoptosis en la próstata dorsal de *Corynorhinus mexicanus* en la etapa de: A1-A3, Inactividad (mayo). B1-B3, Inicio de crecimiento (agosto). C1-C3, Máximo tamaño (noviembre). D1-D3, Involución (enero). Cada número corresponde a las diferentes zonas de cada órgano: 1. Proximal; 2. Intermedia; 3. Distal. Ep, epitelio; Es, estroma, L, lumen; flecha blanca, núcleos de células epiteliales TUNEL (+); Flecha roja, núcleos de células musculares TUNEL (+); Flecha amarilla, núcleos de células basales TUNEL (+); Flecha morada, núcleos de fibroblastos TUNEL (+). Técnica de TUNEL. X400.

En el caso de las etapas de inactividad e inicio de crecimiento, como se mencionó anteriormente, no fue posible identificar los tipos celulares que presentaron evidencias de apoptosis (células TUNEL+), debido al pequeño tamaño de los órganos y a que no había un arreglo que permitiera distinguir los tipos de células, pero si fue posible distinguir entre el epitelio y el estroma de cada una de las glándulas sexuales accesorias, por lo que se hizo una comparación entre los compartimentos de los diferentes órganos en las etapas estudiadas (tabla 2).

Tabla 2. Variación en el número total de células apoptóticas (TUNEL (+)) de los compartimentos epitelial y del estroma por corte histológico de la glándula ampular y de la próstata en sus dos lóbulos, ventral y dorsal, en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *Corynorhinus mexicanus*.

	Epitelio			
	Inactividad	Inicio de crecimiento	Máximo tamaño	Involución
Glándula ampular	14728 ±6854.4 ^a	23713 ±11333.4 ^b	20113 ±6676.2 ^{ab}	25045 ±7171.7 ^b
Próstata lóbulo ventral	1498 ±948.4 ^a	1512 ±359.4 ^a	7540 ±2440.9 ^b	7842 ±3599.6 ^b
Próstata lóbulo dorsal	3138 ±1860.9 ^a	1970 ±860.1 ^a	7312 ±2016.3 ^b	9325 ±3132 ^b
	Estroma			
	Inactividad	Inicio de crecimiento	Máximo tamaño	Involución
Glándula ampular	1390 ±871.6 ^a	3633 ±2283.8 ^b	1983 ±1636.8 ^{ac}	2392 ±795.3 ^{bc}
Próstata lóbulo ventral	819 ±731.2 ^a	549 ±502.2 ^a	1033 ±659.6 ^{ab}	1489 ±678.4 ^b
Próstata lóbulo dorsal	1320 ±1084.7 ^a	461 ±341.5 ^b	729 ±412.5 ^{ab}	1401 ±690.8 ^c

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas del órgano o lóbulo en las diferentes etapas (Kruskal Wallis, Dunn's test *post hoc*, $p \leq 0.05$)

El epitelio de la glándula ampular mostró un aumento estadísticamente significativo el número total de células apoptóticas en la etapa de inicio de crecimiento con respecto a la inactividad. Sin embargo, en la siguiente etapa, máximo tamaño, no mostró diferencias cuando se comparó con la etapa de inactividad e inicio de crecimiento. La etapa de involución, mostró diferencias con respecto a la inactividad, pero no cuando se comparó con las tres etapas restantes, por lo que el número de células apoptóticas se mantuvo estable durante estas últimas etapas (Tabla 2). Este órgano mantuvo un número bajo constante de células apoptóticas en las etapas de inactividad e inicio de crecimiento, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre estas. Sin embargo, sí presentó diferencias entre las dos etapas posteriores, máximo tamaño e involución, por lo que tuvo un aumento estadísticamente significativo en el número de células apoptóticas con respecto a las dos primeras etapas, pero no entre las de máximo tamaño e involución (Tabla 2).

En el estroma de la glándula ampular, hubo un aumento en el número de células apoptóticas de la etapa de inactividad a la de inicio de crecimiento, el cual fue estadísticamente significativo. Sin embargo, la inactividad no mostró diferencias con respecto al máximo tamaño, pero sí cuando se comparó con la etapa de involución.

Por otro lado, entre las etapas de inicio de crecimiento, máximo tamaño e involución no hubo diferencias estadísticamente significativas, por lo que el número de células estromales apoptóticas en la glándula ampular se mantuvo alto (Tabla 2).

El número de células epiteliales en los dos lóbulos prostáticos mostró valores semejantes, siendo bajos en las dos primeras etapas (inactividad e inicio de crecimiento), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas; las siguientes etapas (máximo tamaño e involución), presentaron valores mucho más altos en el número total de células apoptóticas epiteliales, sin mostrar diferencias estadísticamente entre ellas, pero sí con respecto a las dos primeras etapas (Tabla 2).

El número de células apoptóticas en el estroma mostró un comportamiento diferente en los dos lóbulos prostáticos, ventral y dorsal. El lóbulo ventral no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las etapas de inactividad, inicio de crecimiento y máximo tamaño, mientras que sí presentó diferencias con la etapa de involución, mostrando un aumento en el número de células apoptóticas, pero sin haber diferencias entre las últimas dos etapas (Tabla 2). El lóbulo dorsal presentó una disminución en el número de células epiteliales apoptóticas de la etapa de inactividad (1320 ± 1084.7) a la etapa de inicio de crecimiento (461 ± 341.5) siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Posteriormente, en la etapa de máximo tamaño, aumentó el número de células estromales con evidencia de apoptosis (729 ± 412.5), pero este valor no mostró diferencias con respecto a las etapas de inactividad e inicio de crecimiento. En la última etapa del ciclo reproductivo, en la involución, se presentó un aumento en el número de células con evidencia de apoptosis (1401 ± 690.1) que fue estadísticamente significativo respecto a los valores registrados para las etapas anteriores (Tabla 2).

Los tipos celulares identificados con evidencias de apoptosis fueron: secretoras, basales, musculares y fibroblastos. En los dos órganos analizados y en las dos etapas estudiadas, las células secretoras siempre se encontraban presentes en mayor cantidad, siguiendo en cantidad, las células musculares, las basales y finalmente los fibroblastos (Figura 19). Tanto en la glándula ampular como en la próstata dorsal, el número de células secretoras con evidencia de apoptosis fue menor en la etapa

de máximo tamaño, y se presentó un aumento estadísticamente significativo en la etapa de involución. En el caso de la próstata, en su lóbulo ventral no se mostraron diferencias significativas entre estas dos etapas. En el caso de las células basales con evidencia de apoptosis, tanto en la glándula ampular como en el lóbulo dorsal de la próstata, no hubo diferencias significativas entre las etapas de máximo tamaño e involución. Por su parte, lóbulo ventral de la próstata si registró un aumento estadísticamente significativo en el número de células basales con evidencia de apoptosis de la etapa de máximo tamaño a la de involución (Figura 19). En cuanto al número de células musculares apoptóticas en la glándula ampular y la próstata en sus dos lóbulos ventral y dorsal se presentó un aumento significativo de la etapa de máximo tamaño a la etapa de involución. En el caso de los fibroblastos en apoptosis, se registró un número similar para la glándula ampular y la próstata en sus lóbulos ventral y dorsal en las dos etapas, máximo tamaño e involución, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Figura 19).

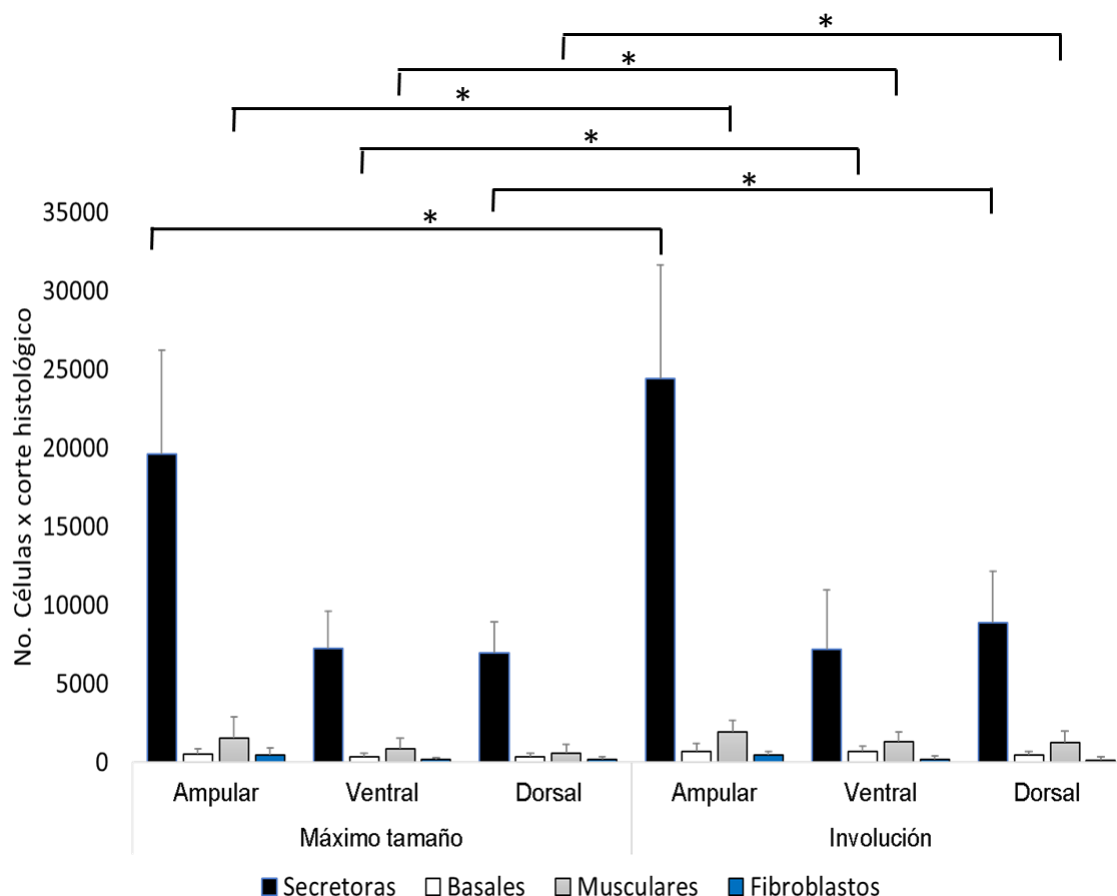


Figura 19. Variación en el número total de células TUNEL (+) en los diferentes tipos celulares: secretoras, basales, musculares y fibroblastos en la glándula ampular, y lóbulos ventral y dorsal de la próstata comparando entre la etapa de máximo tamaño y la de involución del ciclo de las glándulas sexuales accesorias de *Corynorhinus mexicanus*. Los datos se expresan como media $\pm$ DE. El * indica las diferencias estadísticamente significativas del órgano o región en las diferentes etapas (U de Mann-Whitney, $p \leq 0.05$).

10. DISCUSIÓN

Las glándulas sexuales accesorias son órganos que forman parte del sistema reproductor masculino, responsables de aportar el plasma seminal (Prins y Lindgren, 2015) constituido por prostaglandinas, fructosa, ácido cítrico, poliaminas, zinc y enzimas como proteasas y fosfatasa ácida que ayudan a nutrir, activar y asegurar la viabilidad y movilidad de los espermatozoides, y finalmente la uretra (Puga *et al.*, 2014). En *C. mexicanus* se han estudiado dos glándulas sexuales accesorias, la glándula ampular y la próstata (León-Galván *et al.*, 2005, Rodríguez-

Tobón *et al.*, 2010). Esta especie presenta un patrón reproductivo asincrónico temporal dado que la espermatogénesis ocurre en primavera-verano (mayo-septiembre), mientras que las cópulas ocurren en los meses de noviembre y diciembre debido al almacenamiento espermático epididimario que ocurre en otoño-invierno (septiembre-febrero) y al plasma producido por las glándulas sexuales accesorias (Figura 1) (López-Wilchis, 1989).

10.1. Análisis histológico

En *C. mexicanus* se han estudiado dos glándulas de las antes mencionadas, la glándula ampular y la próstata (León-Galván *et al.*, 2005, Rodríguez-Tobón *et al.*, 2010). La primera de estas, es un órgano par, considerándose un agrandamiento glandular asociado a las partes distales del conducto deferente (Chow *et al.*, 1995; Mohammed y Doohi, 2017), en cuanto a su morfología, en la especie *Molossus fortis* se ha observado con forma de lóbulo medial cónico (Krutzsch y Crichton, 1990) y en la especie *Pteronotus gymnonotus* con forma globular (Pimentel *et al.*, 2023), al igual que en *C. mexicanus* (Figura 6).

La próstata presenta una gran variación morfológica entre las especies de murciélagos estudiados y puede presentarse de forma compacta (Sohn *et al.*, 2021), en dos regiones (Puga *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015; Beguelini *et al.*, 2016; Miotti *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Pimentel *et al.*, 2023), o en tres (Negrin *et al.*, 2014; Christante *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015, 2016). La organización histológica de las glándulas sexuales accesorias es similar entre ellas, comprende un compartimento epitelial y un compartimento estromal (Quintar, 2009). La organización celular constituye dos tipos celulares epiteliales en las glándulas sexuales accesorias de algunos murciélagos: secretoras y basales; mientras que, en el compartimento estromal, se encuentran células musculares lisas, con función de contraerse y así descargar el plasma seminal, y los fibroblastos que secretan componentes de la matriz extracelular, lo que mantiene la integridad del órgano, permitiendo una comunicación entre los compartimentos estromales y epiteliales a través de la señalización por factores de crecimiento (Ali y Kulik, 2021). En *C. mexicanus* se identificaron los dos tipos celulares epiteliales mencionados, tanto en la próstata como en la glándula ampular, células secretoras, que se podían observar

con núcleos redondos y parabasales; y células basales, que se encontraron por debajo de las células secretoras, y presentaban núcleos alargados. Otros murciélagos donde también se han encontrado estos tipos celulares epiteliales en la próstata son *A. lituratus* (Santos, et al., 2018); *A. planirostris* (Puga et al., 2014); *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Phyllostomus discolor*, *Desmodus rotundus* y *Platyrrhinus lineatus* (Martins et al., 2015) y en la glándula ampular en *Pteronotus gymnotus* (Pimentel et al., 2023). Como se ha mencionado, algunos autores denominan células secretoras, sin embargo, en este trabajo, se sugiere que se denominen células principales, ya que hay etapas del ciclo reproductivo en donde estas células no poseen actividad secretora.

En la glándula ampular, el revestimiento de los epitelios varía entre especies. Estos epitelios pueden clasificarse de acuerdo a la cantidad de estratos celulares y la forma de las células superficiales, de tal forma que, el epitelio se describe como simple cuando tiene un solo estrato celular de espesor y estratificado cuando posee dos o más estratos celulares, pseudoestratificado debido a que muestra aspecto estratificado, aunque no todas las células alcanzan la superficie, pero todas se encuentran adheridas en la membrana basal ; las células que lo forman pueden ser planas o escamosas cuando el ancho es mayor que su altura, cúbicas cuando el ancho, la profundidad y la altura son iguales, y cilíndricas cuando la altura excede el ancho de la célula (Pawlina, 2015).

Los epitelios también pueden clasificarse como pseudoestratificados, las células que lo constituyen todas descansan sobre la membrana basal, pero sus núcleos se localizan a distintas alturas, lo que da aspecto de diferentes estratos (Pawlina, 2015). *C. mexicanus* presentó una variación en el revestimiento de sus epitelios en las diferentes etapas de la glándula ampular, siendo cúbico pseudoestratificado en la inactividad, cúbico pseudoestratificado a cilíndrico en la etapa de inicio de crecimiento, cúbico a cilíndrico en máximo tamaño y en la involución un revestimiento epitelial cilíndrico pseudoestratificado (Figuras 7 y 8). Al igual que en la glándula ampular, la próstata de *C. mexicanus* mostró una variación en el revestimiento epitelial en las 4 etapas que conforman el ciclo reproductivo analizado (Figura 8). Se observó un epitelio cubico pseudoestratificado en la etapa

de inactividad, cúbico simple en el inicio de crecimiento, mientras que en las etapas de máximo tamaño e involución se mostró un epitelio cúbico simple, con adenómeros que muestran epitelio atípico, que podría ser debido al tipo de secreción holocrina (Puga *et al.*, 2013). El hecho de que tanto la glándula ampular como la próstata en sus dos lóbulos presenten un epitelio diferente en las cuatro etapas estudiadas sugiere que las células podrían estar presentando una dinámica de aumento y disminución de tamaño a lo largo del ciclo reproductivo como se ha descrito para *Eidolon helvum*, especie de murciélago en donde se ha encontrado que las células epiteliales de las vesículas seminales (Abiaezute *et al.*, 2021) y en las glándulas bulbouretrales (Abiaezute *et al.*, 2020) se hipertrofian y secretan más durante la temporada de apareamiento, y posteriormente a esto, las células disminuyen su tamaño y actividad secretora. Otro murciélago en donde se observa un cambio similar es en *Rousettus leschenaulti* en la glándula de Cowper en donde se ha observado que esta glándula presenta hipotrofia de los acinos y de las células epiteliales a medida que se acerca la etapa de inactividad (Nerkar *et al.*, 2016). En algunas especies de murciélagos estudiadas se ha encontrado que presentan un epitelio cilíndrico o cúbico simple, como es el caso de *Macrotus waterhousii* (Krutzsch *et al.*, 1976), cúbico alto a cilíndrico en *Molossus fortis* (Krutzsch y Crichton, 1990); mientras que en *Tadarida brasiliensis*, se observa un epitelio secretor de tipo cilíndrico hasta cúbico bajo (Krutzsch *et al.*, 2002), epitelio pseudoestratificado en *Rhinolophus ferrumequinum* (Sohn *et al.*, 2021) y pseudoestratificado cúbico a cilíndrico en *Pteronotus gymnonotus* (Pimentel *et al.*, 2023).

Por otra parte, el estroma que forma parte de la próstata y la glándula ampular de *C. mexicanus* presentó células musculares lisas, distinguibles por presentar un núcleo delgado alargado y se encontraban rodeando los adenómeros. Los fibroblastos se observaron con núcleos alargados, cerca de las células musculares lisas y se encontraban en menor cantidad que estas (Figura 3). Así como se ha observado en *A. lituratus*, en donde se encontraron estos mismos tipos celulares, células secretoras, basales, musculares y fibroblastos, además de que se cuenta de la presencia de vasos sanguíneos (Santos *et al.*, 2018, Figura 4). En el estroma

de *C. mexicanus* se encontró también la presencia de vasos sanguíneos y se logró hacer una comparación en el número de estos en las diferentes etapas. Se encontró que, en las etapas de inactividad e inicio de crecimiento se presentó una disminución en los vasos, coincidiendo con el tamaño pequeño de los órganos. En las posteriores etapas, máximo tamaño e involución se presentó un aumento en los vasos sanguíneos, lo que coincide con los apareamiento y el aumento de tamaño de la glándula ampular y la próstata (León-Galván *et al.*, 2005), debido a que los vasos sanguíneos tiene como función el transporte de andrógenos (testosterona), factores de crecimiento, así como nutrientes y oxígeno para su desarrollo, crecimiento, síntesis y secreción (Wong *et al.*, 2014), lo cual dará como resultado el plasma seminal que funciona como medio de transporte para los espermatozoides, y así asegurar la viabilidad y movilidad de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino (Puga *et al.*, 2014). Posterior a la fecha de los apareamientos disminuye el número de vasos, y con ello, el tamaño de los órganos. Hasta el momento no se han hecho estudios que realicen la misma comparación por etapas para ninguna especie de murciélago.

Respecto a la forma de secreción de las glándulas sexuales accesorias en los mamíferos puede clasificarse de acuerdo a la forma en que las células liberan al lumen sus productos de secreción, la cual puede ser endocrina (liberan su contenido a la sangre) y exocrina (libera su contenido a la luz de conductos). Este último tipo contiene tres diferentes mecanismos de liberación de los productos de secreción: 1) merocrina, la secreción llega a la superficie de la célula en vesículas limitadas por membranas y vacían su contenido por exocitosis; 2) apocrina, el producto es agregado en la superficie de la célula, rodeado por una capa delgada de citoplasma con membrana plasmática y; 3) holocrina, la secreción se acumula dentro de la célula en maduración, que al mismo tiempo sufre muerte celular programada y tanto los productos de secreción como los restos celulares se eliminan en el lumen (Pawlina, 2015). La glándula ampular de *C. mexicanus* presentó pequeñas vesículas que se desprendían del lumen de las células secretoras, indicando el tipo de secreción merocrina. También se identificó secreción apocrina en sus adenómeros

tubulares en la etapa de máximo tamaño, esta secreción se pudo observar, ya que se encontraban grandes vesículas desprendiéndose de la célula (Figura 7C).

En la glándula de Cowper de murciélago *Rousettus leschenaulti* se presentan estos dos tipos de secreción (Nerkar, *et al.*, 2016). La presencia de secreción merocrina de la glándula ampular en *C. mexicanus* coincide con la etapa de apareamientos, debido a que es en esta etapa donde tienen participación en la nutrición de los espermatozoides, así como del almacenamiento espermático (Saleh *et al.*, 2020; Krutzsch, 2009) debido a las diferentes sustancias que producen, entre estas, fructosa, ácido cítrico y mucinas ácidas unidas a proteínas (Krutzsch, 2000).

La próstata secreta diversas sustancias como zinc, ácido cítrico, fosfatasa ácida y gamma-glutamilttransferasa, entre otras, y en general, segrega un fluido alcalino que protege a los espermatozoides inseminados de las secreciones vaginales y el moco cervical, que son sustancias ácidas (Mokkapati y Dominic, 1976; Lozano, 2018). Esta glándula contribuye aproximadamente con un 25% del eyaculado (Prins y Lindgren, 2015). En la próstata de *C. mexicanus* en sus dos diferentes lóbulos, ventral y dorsal, se reconoció la presencia de secreción apocrina (Figuras 9, 10 y 11), en otros adenómeros se ha mostrado un epitelio atípico, esto podría ser debido al tipo de secreción holocrina, que resulta en la muerte de la célula secretora. Esto también podría ser la causa de que en algunos adenómeros se presentara un epitelio indefinido, debido al desprendimiento de las células secretoras (Figura 9). Este tipo de secreción se presentó en todas las zonas de la próstata únicamente en la etapa de máximo tamaño. La secreción holocrina se observó por primera vez en *A. planirostris* (Puga *et al.*, 2014), posteriormente se encontró en otras especies, como es el caso de *Carollia perspicilata*, *Glossophaga soricina* (Martins *et al.*, 2015) y *A. lituratus* (Santos *et al.*, 2018). La secreción de la próstata en *C. mexicanus* se observó en las etapas de máximo tamaño que es cuando ocurren los apareamientos, y en la involución, por lo que su secreción forma parte del plasma seminal para proteger a los espermatozoides.

10.2. Detección y cuantificación de apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, es decir, que la célula sigue una secuencia ordenada y controlada genéticamente (De Toro, 2006). El

proceso se lleva a cabo de manera individual, es decir, células vecinas no resultan dañadas. Involucra cambios, tanto morfológicos, como bioquímicos (Cascales, 2003; Elmore, 2007; Obeng, 2020). Este tipo de muerte ocurre en las células durante el crecimiento y actúa como un mecanismo de homeostasis que ayuda a mantener las poblaciones celulares de los tejidos y órganos (Norbury y Hickson, 2001, Ziegler y Groscurth, 2004). En órganos como las glándulas sexuales accesorias el crecimiento y funcionamiento normales está regulado por un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte (apoptosis), relacionado con el ciclo reproductivo de la especie (Santos *et al.*, 2018). Tal es el caso de *C. mexicanus*, en donde la glándula ampular y la próstata muestran cambios en su tamaño a lo largo de su ciclo reproductivo. Por lo que es necesario estudiar la presencia de apoptosis en las diferentes etapas del ciclo de estas glándulas, como proceso regulador de los cambios de tamaño en estos órganos que son importantes para la fertilización exitosa de la especie.

En órganos como las glándulas sexuales accesorias el crecimiento y funcionamiento normales está regulado por un equilibrio entre las acciones estimuladoras e inhibitorias de los factores de crecimiento, estos son mantenidos por niveles constantes de andrógenos (Quintar, 2009), estos a su vez activan a los AR. Los principales andrógenos, la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT), regulan la actividad transcripcional del AR. La activación de este receptor en las células del estroma induce la expresión de moléculas de señalización, tales como el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y el Factor de Crecimiento similar a la Insulina-1 (IGF-I), que controlan la supervivencia y la morfogénesis de las células epiteliales. Por otra parte, la inactivación del RA en el estroma conduce a una mayor producción de ligandos de receptores de muerte y a una menor producción de factores de supervivencia, lo que induce apoptosis. A pesar de la expresión del RA en las células epiteliales, el crecimiento y la supervivencia de estas células depende de las células del compartimento estromal, quienes también expresan AR (Ali y Kulik, 2021).

La testosterona se une a las células epiteliales a través de su receptor, donde se puede convertir a DHT, lo que desencadena diferentes cascadas de reacciones,

regulando principalmente las secreciones; mientras que, esta misma hormona también podría actuar sobre las células estromales donde se convertirá por la enzima aromatasa en Estradiol (E2). Esta hormona tiene un papel dual opuesto en la regulación del tejido prostático, ya que con la activación del receptor de estrógenos α participa en la proliferación; mientras que el receptor de estrógenos β provoca la muerte celular (apoptosis), lo que equilibra la acción proliferativa de los andrógenos en el epitelio (Santos *et al.*, 2018).

Ali y Kulik (2021) señalan que, la eliminación de andrógenos en la próstata de ratones, activa las proteínas reguladoras de la apoptosis involucradas en el receptor de muerte (vía extrínseca) y las vías mitocondriales (vía intrínseca). Sin embargo, con la técnica de TUNEL no se puede conocer la vía por la cual las células de las glándulas sexuales accesorias mueren, debido a que esta detecta los fragmentos de ADN como consecuencia de la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 por ambas vías apoptóticas (Green y Llambi, 2015, Palacios *et al.*, 2011), por lo que, si se quisiera reconocer cuál es la vía por la cual se lleva a cabo la apoptosis en estas glándulas, se requiere hacer diferentes técnicas a futuro, tales como inmunohistoquímica o western blot, para detectar proteínas exclusivas de la vía intrínseca (BAX, BAK y caspasa 9) y la vía extrínseca (caspasa 8).

10.2.1. Número total de células

Las glándulas sexuales accesorias de varias especies de murciélagos estacionales que han sido estudiadas, muestran un crecimiento y disminución en tamaño durante su ciclo reproductivo. La testosterona, la DHT y el estradiol son hormonas esteroides clave fundamentales que regulan estos cambios morfológicos (Beguelini *et al.*, 2014). En algunas especies como *A. planirostris* se observaron dos picos secretorios relacionados con aumento gradual de testosterona circulante. Esta hormona facilitó la proliferación celular, así como la síntesis de los productos de secreción, lo que ocasionó un aumento en el peso glandular. Los cambios de tamaño en las glándulas sexuales accesorias de *C. mexicanus*, como se ha mencionado, muestran cambios drásticos de tamaño a lo largo del ciclo reproductivo de esta especie, por lo que, el aumento de tamaño en estos órganos es debido a la proliferación celular.

En el presente estudio no se utilizó un marcaje de proliferación, sin embargo, al realizarse un conteo del total de células en las glándulas sexuales accesorias se aporta información de forma indirecta que, el aumento de tamaño se debe en parte a proliferación celular.

Cuando se analizó el número total de células por corte histológico, para la glándula ampular hubo un aumento de tamaño de la etapa de inactividad respecto a la etapa de inicio de crecimiento; posteriormente este crecimiento se mantuvo en las siguientes dos etapas, sin embargo, en la etapa de máximo tamaño e inactividad los valores fueron similares (Figura 13A).

En los dos lóbulos prostáticos estudiados se encontró que, para el total de células por corte histológico, se presentó un aumento significativo en las etapas de máximo tamaño e involución con respecto a las etapas de inactividad e inicio de crecimiento (Figura 13A).

Cuando se realizó la estandarización del conteo celular por mm² de tejido, tanto la glándula ampular como la próstata, en sus dos lóbulos mostraron que, en las etapas de inactividad e inicio de crecimiento aumentó la cantidad de células y posteriormente disminuyó hacia las etapas de máximo tamaño e involución (Figura 13B). Este resultado sugiere que, además de haber una proliferación en estas últimas dos etapas (Figura 2A), podría presentarse una hipertrofia, lo que indica que las células aumentan su tamaño y su nivel de secreción, resultando en una disminución en el total de células por mm². Esta hipertrofia celular se ha sugerido ocurre en las vesículas seminales y en las glándulas bulbouretrales del murciélago *Eidolon helvum* (Abiaezute *et al.*, 2020; 2021). Para *C. mexicanus* en las etapas de inactividad e inicio de crecimiento, el aumento en el total de células por mm² se puede deber a una hipotrofia, en donde ocurre el caso contrario, la célula disminuye en tamaño y secreción, esto se refleja en un aumento en el total de células por mm². Algo similar a lo anterior se ha observado en la glándula de bulbouretral de *Rousettus leschenaulti*, en donde se ha encontrado que, esta glándula presenta hipotrofia de los acinos y de las células epiteliales a medida que se acerca la etapa de inactividad (Nerkar *et al.*, 2016).

10.2.2. Número total de células con apoptosis

Las glándulas sexuales accesorias de la especie en estudio presentan cambios muy marcados en su tamaño, en mayo estas presentan un valor mínimo, que posteriormente inicia su crecimiento a partir de agosto, presentando un ligero incremento. Continúan su crecimiento en los meses de septiembre-octubre hasta alcanzar un máximo tamaño los meses de noviembre-diciembre. Posteriormente, inician la involución en enero (López-Wilchis, 1989; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2010). El índice apoptótico en *C. mexicanus* fue mayor al 84% en todas las etapas estudiadas. Considerando la información mencionada se esperaba que el mayor índice apoptótico se encontrara en la etapa de involución, debido a que, muchas células fueran eliminadas por este tipo de muerte celular, al ya no participar en la producción de sustancias de secreción, y a que, la glándula entraría en estado de inactividad. Los resultados obtenidos en este estudio contrastan con los obtenidos en *A. planirostris*, en donde se encontró un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas en la región ventral en primavera, con más del 64%, mientras que en las otras estaciones mostró un porcentaje menor al 1%. La liberación de la secreción en la próstata de esta especie es de tipo holocrino, lo que explica el aumento notable del porcentaje de apoptosis en primavera, cuando almacenan la secreción hasta su pico mayor que ocurre en verano (Puga *et al.*, 2014). En *A. lituratus*, se presentaron valores más bajos para la presencia de apoptosis, por debajo del 50% a lo largo del año, lo que indica que hay secreción durante todo el año, considerando que las células mueren debido al tipo de secreción holocrino (Santos *et al.*, 2018). Sin embargo, ninguno muestra similitudes con lo encontrado en este estudio.

Al comparar los datos observados en las figuras 13 y 14, se puede observar que los valores para el total de células y el correspondiente al número de células con evidencia de apoptosis son similares, esto concuerda con índice apoptótico que indica que el valor más bajo para el porcentaje de células con muerte celular de 84% y el máximo de 96% considerando las cuatro etapas estudiadas. Probablemente, valores más bajos para el índice de apoptosis a los encontrados aquí, se hubieran registrado si se hubieran incluido otros meses diferentes a los que

fueron considerados en el presente estudio, y que fueron meses representativos de las diferentes etapas del ciclo de las glándulas sexuales, mayo (inactividad), agosto (inicio de crecimiento), noviembre (máximo tamaño) y enero (involución).

10.2.3. Tipos celulares con presencia de apoptosis

En el presente estudio se pudo observar la presencia de los tipos celulares que presentan evidencia de muerte celular por apoptosis en las glándulas sexuales accesorias de *C. mexicanus* en las etapas de máximo tamaño e involución. En los dos órganos estudiados y en las dos etapas estudiadas las células secretoras siempre se encontraban presentes en mayor cantidad, seguidos de las células musculares, células basales y fibroblastos (Figura 19). Se esperaba que, únicamente las células epiteliales fueran las que presentaran apoptosis. Diferentes trabajos que se han realizado se han enfocado en analizar el efecto de la privación de andrógenos en la próstata (Kerr y Searle, 1973; Neville *et al.*, 1984; Beguelini *et al.*, 2015a; Beguelini *et al.*, 2015b; Puga *et al.* 2016), la glándula bulbouretral y la vesícula seminal (Tsuji *et al.*, 1998), cuyos resultados indican que el epitelio es el sitio donde ocurre la apoptosis. Esto fue confirmado por Puga *et al.*, (2014), quienes observaron que, el aumento de apoptosis ocurrió tanto en las células secretoras como en las basales, sin embargo, tiene mayor impacto en las células secretoras.

Para verificar el correcto funcionamiento de la técnica de TUNEL se utilizaron controles positivos y negativos en cada uno de los experimentos realizados. Por otra parte, cabe resaltar que para el presente estudio, si bien se emplearon muestras (glándulas sexuales accesorias) que fueron obtenidas de individuos capturados 10 años antes, estas muestras biológicas representaron la oportunidad de estudiar un fenómeno importante que participa en la regulación de los cambios ocurridos en las glándulas a lo largo del ciclo anual, sin la necesidad de extraer nuevos animales, aspecto clave en la conservación de la especie y resalta la importancia de las colecciones biológicas.

11. CONCLUSIÓN

En el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, las glándulas ampulares y la próstata se caracterizan por presentar dos tipos de células epiteliales, basales y secretoras; mientras que en el estroma se observaron las células musculares lisas y

fibroblastos. Se presentaron evidencias de apoptosis en todos los tipos celulares, tanto en la etapa de máximo tamaño como en la de involución.

El índice apoptótico fue en general elevado, igual o superior a 84% tanto para la glándula ampular como para la próstata en las cuatro etapas estudiadas. Por lo tanto, la apoptosis no regula los cambios de tamaño en las glándulas ampulares y la próstata.

El número de vasos sanguíneos aumentó en las etapas de máximo tamaño e involución; mientras que en las etapas de inactividad e inicio de crecimiento la presencia de estos era mínima, lo que permite reconocer la existencia de una dinámica de desarrollo de la vasculatura asociada al ciclo de las glándulas sexuales accesorias.

Se encontró un aumento en el número de vasos sanguíneos en las etapas de máximo tamaño e involución; mientras que, en las etapas de inactividad e inicio de crecimiento la presencia de estos era mínima, hecho que permite reconocer la existencia de una dinámica de desarrollo de la vasculatura asociada al ciclo de las glándulas sexuales accesorias.

12. PERSPECTIVAS

Estudiar la proliferación celular por inmunohistoquímica con PCNA en las etapas estudiadas aquí complementaría el estudio de muerte celular por apoptosis.

Estudiar los AR Y ER y su variación a lo largo del ciclo de las glándulas sexuales accesorias sería un punto importante para relacionarlo con la muerte celular por apoptosis.

Revisar si en las glándulas sexuales accesorias, los cambios están regulados por hipo e hipertrofia, además de estar relacionados con proliferación y muerte.

Realizar estudios que aborden aspectos relacionados con la angiogénesis asociada al ciclo de las glándulas sexuales accesorias, empleando marcadores específicos de desarrollo vascular.

13. ANEXOS

13.1. Anexo I Técnica histológica

Se utilizaron las glándulas sexuales accesorias (glándulas ampulares y próstata) que previamente habían sido fijadas con solución de formalina al 4% en solución amortiguada de fosfatos (PBS) pH 7.4. Estas glándulas preservadas fueron sometidas a la técnica histológica estándar:

Se realizó una deshidratación en soluciones de concentración gradual de etanol, y aclaramiento con xileno. Posteriormente se realizó la inclusión en parafina; las diferentes soluciones y los tiempos empleados se indican a continuación:

Etanol 80%	1 ½ horas.
Etanol 96%	1 hora
Etanol 96%	1 hora
Etanol 96%	1 hora
Etanol absoluto	1 hora
Etanol absoluto	1 hora
Etanol absoluto	1 hora
Etanol-Xileno 1:1	1 hora
Xileno	1 ½ horas
Xileno	1 ½ horas
Paraplast Plus I-xileno (1:1)	2 horas a 60°C
Paraplast Plus II	4 horas a 60°C
Paraplast Plus	a 60°C. Y se formaron los bloques

Los órganos incluidos fueron cortados en un microtomo de rotación LEICA modelo 1510. Se obtuvieron cortes seriados longitudinales a través del complejo de glándulas sexuales accesorias, en el sentido súpero-inferior, para contar con secciones de los órganos en planos frontales de 7 µm de espesor. Las secciones

de tejido fueron montadas en un portaobjetos recubierto con poli-L lisina 0.01% (V/V) como adherente tisular.

Después de haber obtenido los cortes, se realizó la tinción con Hematoxilina-Eosina, para ello se realizaron una serie de pasos:

Desparafinación:

1. Xilol: 5 minutos.
2. Xilol: 5 minutos.
3. Xilol-Alcohol absoluto: 5 minutos.
4. Alcohol absoluto: 3 minutos.
5. Alcohol 96°: 3 minutos.
6. Alcohol 80°: 3 minutos.
7. Alcohol 60°: 3 minutos.
8. Agua destilada: 2 minutos.
9. Hematoxilina de Harris: 5-7 minutos.
10. Lavado con agua corriente.
11. Alcohol ácido: Lavado.
12. Lavado con agua destilada.
13. Solución de Scott: 1 a 5 minutos.
14. Lavado con agua destilada. Tinción con eosina.
15. Eosina: 3 minutos.
16. Lavado con agua destilada. Deshidratación.
17. Alcohol 96°: Lavado.
18. Alcohol 96°: Lavado.
19. Alcohol 100°: Lavado.
20. Alcohol 100°: Lavado.

Aclaramiento:

21. Xilol-Alcohol absoluto: Lavado.
22. Xilol: Lavado.

23. Xilol: Lavado.

24. Montaje con Entellan (Merk).

13.2. Anexo II Técnica de TUNEL

Para el amrcaje de células en apoptosis se empleó el Kit de Thermo Fisher (Click-iT™ Plus TUNEL Assay for In Situ Apoptosis Detection, Alexa Fluor™ 488 dye) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Desparafinación:

Primeramente, se realizó el calentamiento de las laminillas en termoplatina, 30 minutos a 37°C. En seguida se sumergieron a las siguientes soluciones:

Solución	Tiempo (min)
1. Xileno	5
2. Xileno	5
3. Xileno - OH 100	3
4. OH 100	5
5. OH 100	3
6. OH 95	3
7. OH 85	3
8. OH 75	3
9. OH 50	3
10. PBS	5

Fijación y permeabilización:

Se agregó fijador: Paraformaldehído 4%. A 37°C por 15 minutos en cámara húmeda. Se realizaron dos lavados con PBS, 5 min c/u.

Se agregó proteinasa K (20 µg/ml) hasta cubrir todo el tejido y se incubaron en cámara húmeda por 15 min. Se realizaron dos lavados con PBS de 5 minutos c/u y se enjuagó con agua destilada por 5 min.

Control positivo (+):

Se seleccionaron secciones de tejido para ser tratadas con DNAsa 1 (1µ/mL) diluida en buffer de reacción por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se agregó buffer de reacción por 10 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Reacción TdT para la transferencia de nucleótidos a los fragmentos de ADN generados por apoptosis:

Se retiró el buffer de reacción y se agregó el nucleótido (EdUTP) (1µ/mL) a todas las muestras, incluyendo controles positivos y negativos. En el caso de la enzima (TdT) (2µ/mL) se omitió en el control negativo.

Se incubaron las muestras por 60 minutos a 37°C en humedad y se enjuagaron con agua destilada.

Se lavaron con BSA + Tritón por 5 min y se enjuagaron con PBS.

Reacción Click- iT Plus para la unión del fluorocromo al nucleótido:

Se preparó una solución denominada supermix (en oscuridad) consistente de:

- Buffer de Reacción
- Protector de cobre
- Alexa Fluor Picolyl Azida (fluorocromo)

Se preparó la mezcla de reacción TUNEL:

- Supermix
- E (buffer)

Se agregó e incubó por 30 min 37°C. Se realizaron lavados con BSA 1% y se enjuagó con PBS dos veces.

Se agregó Hoechst para teñir los núcleos del número total de células, ya sean vivas o muertas, y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagó con PBS dos veces y se montó con glicerol en PBS. Finalmente se selló con barniz. Se mantuvieron las muestras protegidas de la luz y se llevaron para su observación en

epifluorescencia del microscopio confocal láser de barrido para la detección de células en apoptosis (células TUNEL+).

14. BIBLIOGRAFÍA

- ABIAEZUTE, C. N., NWAOGU, I. C. & IGWEBUIKE, U. M. 2020. Histology, ultrastructure, and seasonal variations in the bulbourethral gland of the African straw-colored fruit bat *Eidolon helvum*. *Journal of Morphology*, 281, 1446-1455.
- ABIAEZUTE, C. N., NWAOGU, I. C., OBIDIKE, I. R. & IGWEBUIKE, U. M. 2021. Seasonal variations in the morphology of the seminal vesicles of the African straw-coloured fruit bat (*Eidolon helvum*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 50, 387-395.
- ALBERNAZ, E. S. S., SANTIAGO, C. S., GUERRA, L. H. A., SANTOS, F. C. A., GÓES, R. M., MORIELLE-VERSUTE, E., TABOGA, S. R., SOUZA, C. C. & BEGUELINI, M. R. 2021. The prostate of the bat *Artibeus lituratus*: Seasonal variations, abiotic regulation, and hormonal control. *Journal of Morphology*, 282, 1188-1207.
- ALLEN T. C. 1992. Hematoxylin and eosin. En Prophet E, Mills B, Arrington JB, Sobin LH (ed). *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington DC: American Registry of Pathology.
- ALI, A. & KULIK, G. J. C. 2021. Signaling pathways that control apoptosis in prostate cancer. *Cancers*, 13, 1-34.
- BEGUELINI, M. R., GÓES, R. M., RAHAL, P., MORIELLE-VERSUTE, E. & TABOGA, S. R. 2015a. Impact of the processes of total testicular regression and recrudescence on the epididymal physiology of the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Plos One*, 10, 1-18
- BEGUELINI, M. R., GÓES, R. M., RAHAL, P., MORIELLE-VERSUTE, E. & TABOGA, S. R. 2015b. Impact of the processes of testicular regression and recrudescence in the prostatic complex of the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Morphology*, 276, 721-732.
- BEGUELINI, M. R., GÓES, R. M., TABOGA, S. R. & MORIELLE-VERSUTE, E. 2014. Two periods of total testicular regression are peculiar events of the annual reproductive cycle of the black *Myotis* bat, *Myotis nigricans*

- (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reproduction, Fertility and Development*, 26, 834-846.
- BEGUELINI, M. R., PUGA, C. C., MORIELLE-VERSUTE, E. & TABOGA, S. R. J. 2016. Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bats *Noctilio albiventris* (Noctilionidae) and *Rhynchonycteris naso* (Emballonuridae). *Journal of Morphology*, 277, 1459-1468.
- BERGERSON, W., AMSELGRUBER, W., SINOWATZ, F. & BERGERSON, M. J. C. 1994. Morphological evidence of sperm maturation in the ampulla ductus deferentis of the bull. *Tissue Research*, 275, 537-541.
- CASCALES, A. M. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69, 37-64.
- CERVANTES, M. I., ARENAS-RIOS, E., MIGUEL ANGEL, L.-G., RICARDO, L.-W., DEMETRIO, A. & ADOLFO, R. 2008. Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54, 196-204.
- BURGIN, C. J., COLELLA, J. P., KAHN, P. L. & UPHAM, N. S. J. J. O. M. 2018. How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy*, 99, 1-14.
- CHOW, P. H., YUEN, A. C. Y. & CHENG, L. Y. L. 1995. Quantitative electrophoretic study of the modification of sperm plasma membrane by the ampullary gland in the golden hamster. *Archives of Andrology*, 34, 53-61.
- CHRISTANTE, C. M., BEGUELINI, M. R., PUGA, C. C. I., NEGRIN, A. C., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P. S. L. & TABOGA, S. R. 2015. Structure, histochemistry and seasonal variations of the male reproductive accessory glands in the Pallas's mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Reproduction, Fertility and Development*, 27, 313-322.
- CRICHTON, E. G. 2000. Sperm storage and fertilization. En Crichton E. G. y Kruttsch P.H. (ed). *Reproductive biology of bats*. 1 ed. San Diego California: Academic Press.

- DANMAIGORO, A., ONU, J. E., SONFADA, M. L., UMARU, M. A. & OYELOWO, F. O. 2014. Histology and histometric anatomy of the male reproductive system of bat (*Eidolon helvum*). *Journal of Histology*, 2014, 1-6.
- DE TORO, G. J. 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Actas Hispanoamericanas de Patología*, 1, 1-6.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.
- ERSHAW-YOUNG, C. & MAXWELL, W. J. R. I. D. A. 2012. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 369-375.
- FLEMING, T. H., HOOPER, E. T. & WILSON, D. E. J. 1972. Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles, and movement patterns. *Ecology*, 53, 555-569.
- GREEN, D. R. & LLAMBI, F. 2015. Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, 1-24.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- KERR, J. F. R. & SEARLE, J. 1973. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Archiv B Cell Pathology*, 13, 87-102.
- KRUTZSCH, P. H., WATSON, R. H. & LOX, C. D. 1976. Reproductive biology of the male leaf-nosed bat, *Macrotus waterhousii* in Southwestern United States. *The Anatomical Record*, 184, 611-635.
- KRUTZSCH, P. & CRICHTON, E. 1990. Observations on the reproductive anatomy of the male *Molossus fortis* (Chiroptera: Molossidae) with comments on the chronology of reproductive events. *Mammalia*, 54, 287-296.

- KRUTZSCH, P. H. 2000. Anatomy, physiology and cyclicity of the male reproductive tract. En Crichton E. G. y Krutzsch P.H. (ed). *Reproductive biology of bats*. 1 ed. San Diego California :Academic Press.
- KRUTZSCH, P. H., FLEMING, T. H. & CRICHTON, E. G. 2002. Reproductive biology of male Mexican free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Journal of Mammalogy*, 83, 489-500.
- KYPRIANOU, N. & ISAACS, J. T. 1988. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology*, 122, 552-562.
- LABRIE, F. 2011. Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment. *Nature Reviews Urology*, 8, 73-80.
- LEE, C., SENSIBAR, J. A., DUDEK, S. M., HIIPAKKA, R. A. & LIAO, S. J. 1990. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biology of Reproduction*, 43, 1079-1086.
- LEÓN-GALVÁN, M. A., LÓPEZ-WILCHIS, R., HERNÁNDEZ-PÉREZ, O., ARENAS-RÍOS, E. & ROSADO, A. 2005. Male reproductive cycle of Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *The Southwestern Naturalist*, 50, 453-460.
- LÓPEZ-WILCHIS, R. 1989. *Biología de Plecotus mexicanus (Chiroptera: Vespertilionidae) en el estado de Tlaxcala, México*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- LOZANO, H. J. R. 2018. Male accessory glands and sperm function. En Meccariello R y Chianese R. (ed). *Spermatozoa: Facts and Perspectives*. 1 ed. Nápoles, Italia: IntechOpen.
- MAHMUD, M. A., JOSEPHAT, O., ABDULLAHI, S. S., AMINU, U. M., ABDURRAHMAN, B., AKAWU, S. H., ABUBAKAR, D. & SHEHU, S. 2016. Species variation on gross morphology and gross morphometry of accessory sex glands in one-humped camel bull (*Camelus dromedarius*), Uda Ram and Red Sokoto Buck. *World's Veterinary Journal*, 6, 53-58.
- MARTINS, F. F., BEGUELINI, M. R., PUGA, C. C. I., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P. S. L. & TABOGA, S. R. 2016. Morphophysiology and

- ultrastructure of the male reproductive accessory glands of the bats *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* and *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Acta Histochemica*, 118, 640-651.
- MARTINS, F. F., PUGA, C. C. I., BEGUELINI, M. R., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P. S. L. & TABOGA, S. R. 2015. Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bat species from the five Brazilian subfamilies of the family Phyllostomidae (Chiroptera). *Journal of Morphology*, 276, 470-480.
- MIOTTI, M. D., MOLLERACH, M. I. & BARQUEZ, R. M. 2018. Anatomy and histology of the prostate and glands of Cowper in three species of neotropical bats. *Journal of Morphology*, 279, 294-301.
- MOHAMMED, H. H. & DOOHI, H. K. 2017. Histomorphology and histochemistry study of ampulla of vas deferens in adult indigenous gazelle (*Gazella subgutturosa*). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 1452-1455.
- MOKKAPATI, S. & DOMINIC, C. J. 1976. Sites of production of fructose and citric acid in the accessory reproductive glands of three species of male chiropterans. *Biology of Reproduction*, 14, 627-629.
- NERKAR, A. A., GUJAR, M. P. & GADEGONE, M. M. 2016. Ultrastructure of the secretory epithelial cells of the Cowper's gland in the Indian fruit bat, *Rousettus leschenaulti* (Desmarest) during the reproductive cycle. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 4, 156-161.
- NORBURY, C. J. & HICKSON, I. D. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41, 367-401.
- OBENG, E. J. 2020. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 1133-1143.
- PALACIOS, E., MIRÓ, M. & BOTICARIO, C. J. 2011. Muerte celular y cáncer: Las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. *Anales de la Real Academia de Doctores de España*, 15, 191-215.

- PAWLINA, W. 2015. Tejido epitelial. En: Pawlina, W. y Michael H. R. P. (ed). *Histología: Texto y Atlas, Correlación con Biología Celular y Molecular*. 7ª ed. Barcelona, España: Médica Panamericana.
- PIMENTEL, P. B., SANTIGO, C. S., FERRAZ, J. F., MORIELLE-VERSUTE, E., TABOGA, S. R., SOUZA, C. C. & BEGUELINI, M. R. 2023. Morphophysiology of the male reproductive accessory glands of the bat *Pteronotus gymnonotus* (Mormoopidae: Chiroptera). *Tissue and Cell*, 80, 101991.
- POIANI, A. 2006. Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60, 289-310.
- PRINS, G. & LINDGREN, M. 2015. Accessory Sex Glands in the Male. En Plant, T. M. y Zeleznik, A. J. (ed). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. (Vol 1). San Diego California: Academic Press.
- PROPHET E.B. 1992. Fixation. En Prophet E, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. (ed). *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, DC: American Registry of Pathology.
- PUGA, C. C., BEGUELINI, M. R., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P. S., TABOGA, S. R. J. & CELL 2016. The effects of castration followed testosterone supplementation in prostatic complex of *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Tissue and Cell*, 48, 252-264.
- PUGA, C. C. I., BEGUELINI, M. R., MARTINS, F. F., FALLEIROS JR, L. R., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P. S. L. & TABOGA, S. R. 2014. Seasonal changes in the prostatic complex of *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *General and Comparative Endocrinology*, 197, 33-42.
- PUGA, C. C. I., BEGUELINI, M. R., NEGRIN, A. C., CHRISTANTE, C. M., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P. S. L. & TABOGA, S. R. 2013. Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the neotropical flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 558-569.

- QUINTAR, A. A. 2009. *Respuesta de la glándula prostática a la inflamación: Patrón morfológico y modulación de moléculas epiteliales de defensa*. Doctorado en Medicina y Cirugía Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Médicas
- RACEY, P. A. 1979. The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56, 391-402.
- RODRÍGUEZ-TOBÓN, A. 2011. *Análisis macro y microestructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus**. . Tesis de Maestría en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana.
- RODRÍGUEZ-TOBÓN, A. 2016. *Estudio de la maduración de espermatozoides epididimarios del murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus**. Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana.
- RODRIGUEZ-TOBÓN, A., ARENA-RÍOS, E. & LEÓN-GALVÁN, M. A. 2010. El almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, adaptación que permite sincronizar el periodo de apareamientos en murciélagos. *Contactos*, 78, 58-64.
- SALEH, A. M. M., SAYED, R. K. A. & HAMODA, H. 2020. Gross, Light and Scanning Electron Microscopic Studies on the Ampulla Ductus Deferentis of Dromedary Camel with Special Reference to its Seasonal Variations. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 10, 41-48.
- SANTOS, R. T., PIRES, L. R., ALBERNAZ, E. S., ANDRADE, C. S., SANTIAGO, C. S., MORIELLE-VERSUTE, E., TABOGA, S. R. & BEGUELINI, M. R. J. J. O. M. 2018. Morphological analysis of the male reproductive accessory glands of the bat *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae: Chiroptera). *Tissue and Cell*, 279, 228-241.
- SOHN, J. H., FUKUI, D., NOJIRI, T., MINOWA, K., KIMURA, J. & KOYABU, D. 2021. Three-dimensional and histological observations on male genital organs of greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. *Journal of Mammalian Evolution*, 28, 559-571.

- SOTO-CASTRUITA, A. Datos no publicados. *Estudio morfofisiológico de la prostata y de la glándula ampular de Corynorhinus mexicanus (Chiroptera: Vespertilionidae)*. . Doctorado en Ciencias Bioógicas y de la Salud Tesis Doctoral. , Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- SUZUKI, K., NISHIYAMA, T., HARA, N., YAMANA, K., TAKAHASHI, K. & LABRIE, F. 2007. Importance of the intracrine metabolism of adrenal androgens in androgen-dependent prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 10, 301-306.
- TSUJI, M., TERADA, N., SUGIHARA, A., TSUJIMURA, T., DONJACOUR, A. A. & CUNHA, G. R. 1998. Later onset of apoptosis in the bulbourethral glands after castration compared to that in the seminal vesicles. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 67, 113-118.
- VELÁSQUEZ M., COMAS R. O., ROMÁN R. R. & RIVAS V. J. F. 2010. Lineamientos Para La Conducción Ética de la Investigación, la Docencia y la Difusión de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.
- WANG, H.-C., ZHANG, H.-F., GUO, W.-Y., SU, H., ZHANG, K.-R., LI, Q.-X., YAN, W., MA, X. L., LOPEZ, B. L. & CHRISTOPHER, T. A. 2006. Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation. *Apoptosis*, 11, 1453-1460.
- WONG, L., GIPP, J., CARR, J., LOFTUS, C. J., BENCK, M., LEE, S., MEHTA, V., VEZINA, C. M. & BUSHMAN, W. 2014. Prostate angiogenesis in development and inflammation. *The Prostate*, 74, 346-358.
- ZIEGLER, U. & GROSCURTH, P. 2004. Morphological features of cell death. *Physiology*, 19, 124-128.
- ZORTÉA, M. J. 2003. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Biology*, 63, 159-168.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00109

Matrícula: 2202800666

LA APOPTOSIS EN LA PRÓSTATA
Y GLÁNDULAS AMPULARES A LO
LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO
ASINCRÓNICO DE *Corynorhinus
mexicanus*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 19:00 horas
del día 27 del mes de abril del año 2023 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN
DRA. EDITH ARENAS RIOS
DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON
DRA. ROSA ANGELICA LUCIO LUCIO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen
de Grado cuya denominación aparece al margen, para la
obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: BEDA BENITO ALEMAN

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

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la
interesada el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.



BEDA BENITO ALEMAN
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

SECRETARIA

DRA. ROSA ANGELICA LUCIO LUCIO