

Unidad Iztapalapa

División C.B.S

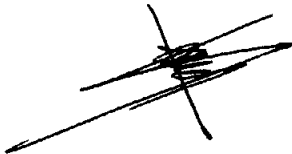
Grado Licenciatura

Nombre del participante

Nadia Suhail Sánchez Camacho

Nombre y firma del asesor

Dr. Arturo Salame Méndez

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, diagonal strokes that form a stylized, somewhat abstract representation of the name.

Lugar de la realización del trabajo

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina. Iztapalapa, Méx. D, F.

Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos AS-112. Departamento de Biología, área zoología.

Laboratorio del Área de Reproducción Animal Asistida S- 229.

Fecha de inicio: 07/10/2004

Fecha de terminación: 4/05/2005

**“VALORACIÓN INTERANUAL DE LOS CONTENIDOS DE HORMONAS ESTEROIDES EN
HECES DE MACHOS DEL MURCIÉLAGO *Corynorhinus mexicanus*”.**

Nombre: **Sánchez Camacho Nadia Suhail**

Matricula: **97224449**

Registro: **B.037.04**

Fecha de entrega: **25/04/2005**

Nadia S. Sánchez Camacho¹, Dr. Ricardo López Wilchis², Dr. Arturo Salame Méndez³.

¹ Licenciatura en Biología, CBS, UAMI; ² Zool., Biol., CBS, UAMI; ³ ARAA, Biol. Reprod. CBS, UAMI.

En este Servicio Social se determinó el contenido de hormonas esteroides: progesterona -P4-, androstendiona -A-, testosterona -T-, y cortisol -C- en heces de machos adultos del murciélago orejudo (*Corynorhinus mexicanus*), y así establecer la correlación con algunos de los eventos reproductivos de esta especie de vespertilionido endémico de México. La P4 tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$) de enero a diciembre; de abril a mayo; mayo-junio ($P < 0.001$); junio-julio y de julio a agosto. Los bajos contenidos se mantienen en cantidades basales (0.04 ± 0.03 ng/gr = 40 ± 30 pg/gr). Por estación del año, el máximo se encuentra en verano, sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$). La A tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$) tan solo de abril a mayo y de junio a julio ($P < 0.001$). Su concentración basal fue de 0.12 ± 0.12 ng/gr (121.8 pg/gr). Por estación del año, el máximo se encontró en primavera pero no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$). Por su parte, la T presentó diferencias significativas ($P < 0.001$) de mayo a junio y de julio a agosto. Siendo su concentración basal de septiembre a abril (0.020 ± 0.13 ng/gr = 20 pg/gr). Estacionalmente tuvo diferencias significativas ($P < 0.001$) entre la primavera y el verano, así como entre el verano y el otoño. Teniendo su máximo en el verano. Para el contenido de C se tuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$) de abril a mayo, junio a julio, y julio a agosto. Siendo sus concentraciones basales de 0.40 ± 0.14 µg/gr (400 ± 140 ng/gr). Por estación del año este glucocorticoide presentó su máximo en primavera, sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre estaciones. Los contenidos de P4, A, y T al incrementarse a partir de la primavera, coincidieron con el tiempo durante el cual van saliendo de su torpor y se inicia el crecimiento del tamaño testicular; siendo su máximo a inicios del verano, tiempo en el cual son abundantes los espermatozoides. Por su parte, el cortisol uno de los principales glucocorticoides, así como ser indicador del grado de estrés, al ser diferente a partir de finales de la primavera -abril y mayo- y durante el verano -de junio a agosto-, sugiere que en este periodo los machos adultos de *C. mexicanus* tienen un mayor gasto energético y por ende ser alto su estrés. Al quedar la P4, A, y T en concentraciones basales a partir del otoño, aumenta el tamaño de las glándulas accesorias y el de los epidídimos. Concordando con las cópulas que se dan durante el invierno, época en que se estimula su libido. Además, de incrementarse el contenido de cortisol durante otoño-invierno hecho que puede ser atribuido a que los machos adultos están estresados debido a que se lleva a cabo el apareamiento. Es decir, deben estar alertas para lograr la cópula con el mayor número posible de hembras en celo, y así asegurar su reproducción. En conclusión, las cuatro hormonas cuantificadas, tres de las cuales están relacionadas con la fisiología reproductiva (A, T, y P4) y una de ellas (C) relacionada con el metabolismo e indicador del estado de estrés, permitieron tener un marco de referencia endocrino de la biología de *Corynorhinus mexicanus* que se ajusta al modelo reproductivo asincrónico descrito para esta familia de quirópteros. Por lo que, valorar el contenido de hormonas esteroides en heces, es un método no invasivo debido a que, no provoca estrés ni la muerte del individuo para valorar indicadores -v. gr. hormonas esteroides- de su fisiología, permitiendo además, correlacionar eventos endocrinos con procesos de la actividad reproductiva tanto etológicos (apareamiento) como fisiológicos (espermatogénesis).

Palabras clave: Vespertilionidos, *Corynorhinus mexicanus*, reproducción, hormonas esteroides, heces fecales.

**“VALORACIÓN INTERANUAL DE LOS CONTENIDOS DE HORMONAS ESTEROIDES EN
HECES DE MACHOS DEL MURCIÉLAGO *Corynorhinus mexicanus*”**

INTRODUCCIÓN

Los estudios referentes a la biología de murciélagos (Galindo-Galindo *et al.*, 2000; Heideman y Powel, 1998; Gustafson, 1979) han permitido dilucidar diversos patrones reproductivos. Por ejemplo, a partir de procesos fisiológicos y endocrinos resumidos por Martin y Bernard (2000), y Kwiecienski y Damassa (2000) se han establecido dos modelos reproductivos. El primero es el sincrónico en el que existe concordancia en la espermatogénesis y el crecimiento de glándulas accesorias con la concentración circulante de andrógenos y proteínas acarreadoras de ellos y de otros esteroides (siglas en inglés SBG) (Fig. 1), y el segundo es asincrónico es decir, no existe una relación entre espermatogénesis y crecimiento de glándulas accesorias con los contenidos circulantes de andrógenos y las SBG (Fig. 1). El primer modelo se encuentra en filostomidos, por ejemplo, en *Macrotus californicus* y el segundo en vespertilionidos, por ejemplo, *Myotis lucifugus*.

Macrotus californicus (Kruttsch *et al.*, 1976) que es un filostómido no hibernante la actividad de las glándulas accesorias y la espermatogénesis coinciden con el pico máximo de testosterona (T) plasmática durante el verano, concordando con la actividad de las células de Leydig. Pero al ir disminuyendo la concentración plasmática de T a finales del verano, y estar en concentraciones basales durante el invierno, no hay una aparente estimulación de glándulas accesorias (Fig. 1).

Por su parte, el modelo asincrónico en vespertilionidos machos de *Myotis lucifugus* (Gustafson y Shemesh, 1976); *Nyctalus noctula* (Racey, 1974); *Vespadelus vulturnus* (Tideman, 1993), y *Nyctophilus geoffroy* (Hosken *et al.*, 1998) durante el invierno su líbido se estimula, y los epidídimos y glándulas accesorias son activos, hipertrofiándose en las

subsecuentes estaciones del año, coincidiendo con la disminución en el tamaño y función de las células de Leydig, por lo tanto, las concentraciones de T plasmáticas y las SBG permanecen en cantidades basales. Pero durante la primavera, al salir de su torpor o hibernación, se inicia el crecimiento del tamaño testicular, la espermatogénesis, y la función de las células de Leydig; lo cual se ve reflejado con el incremento de T plasmática y de las SBG (Gustafson y Shemesh, 1976), sin embargo, es escaso o nulo el incremento en el tamaño de las glándulas accesorias (Fig. 1).

Los murciélagos que almacenan espermatozoides en el epidídimo y que tienen una libido prolongada durante el invierno (Gustafson, 1979; Krutzsch, 1975, 1961; Racey y Tam, 1974), pueden poseer uno de los dos modelos reproductivos dependiendo de la actividad diferencial de las células de Leydig. Lo cual explicaría porque los vespertilionidos tienen fertilización, implantación, y desarrollo embrionario retardado, procesos que a su vez están relacionados con la altitud y latitud (Kunz, 1982; Wimsatt, 1979, 1960b), así como con factores ambientales. Por ejemplo, la baja temperatura que provoca en ellos torpor o hibernación, favorece en las especies hibernantes el haber una separación temporal de la libido, la espermatogénesis, y el desarrollo de glándulas accesorias (Wimsatt, 1969, 1960). Sin embargo, en el murciélago orejudo *Corynorhinus mexicanus* su patrón reproductivo no se ajusta a ninguno de los dos patrones descritos para los murciélagos hibernantes ni tampoco al de los vespertilionidos no hibernantes (López-Wilchis 1989). Más bien se comporta como los murciélagos de zonas templadas con periodos de bajas temperaturas (v. gr. *Myotis velifer*) (López-Wilchis, 1989).

C. mexicanus es endémico de México, habita zonas templadas localizadas por arriba de los 2000 m. Su distribución abarca las partes más altas y húmedas de la Sierra Madre Oriental, el Eje Volcánico Transverso y la Sierra Madre Occidental, así como haber registros para Yucatán y Quintana Roo (Hall, 1981; Koopman, 1974) (Fig. 2A). En los machos la espermatogénesis se inicia a finales de la primavera cesando a partir de

mediados del otoño, lo cual se ve reflejado en la disminución del diámetro de los túbulos seminíferos; siendo más evidente a mediados del invierno, tiempo durante el cual se aprecian procesos degenerativos hasta llegar a su constricción a mediados de la primavera (López-Wilchis 1989) (Fig. 3). El mayor desarrollo testicular se da a finales del verano y va disminuyendo a principios del invierno (Fig. 3). Por su parte, el desarrollo de los epidídimos y las glándulas accesorias (v. gr. ampular y/o de Cowper) se inicia a principios del otoño -tiempo durante el cual los epidídimos ya tienen una abundante cantidad de espermatozoides- teniendo su máximo crecimiento durante el invierno. Estaciones durante las cuales se lleva a cabo el apareamiento -cópulas- debido a que las hembras están en celo -estro- (Fig. 3). De tal manera, que en los machos de esta especie, el almacenamiento de los espermatozoides prácticamente no existe o se da por un lapso de tiempo muy corto. Así como, no tener fertilización retardada debido a que la ovulación y la fertilización están relacionadas con el periodo de celo -estro- (López-Wilchis, 1989). Además de que las hembras tienen un periodo largo de almacenamiento de espermatozoides -4 semanas- (León-Galván *et. al.*, 1999). Por lo antes mencionado, *C. mexicanus* no presenta una concordancia entre el desarrollo testicular con el desarrollo de los epidídimos y las glándulas accesorias; hechos que caracterizan a los patrones reproductivos de los murciélagos no hibernantes (Kruttsch, 1979).

Durante el invierno, las hembras de *C. mexicanus* ya presentan implantación y embriones hasta en su segunda etapa de desarrollo; quedando la mayoría preñadas a finales de la estación (Fig. 3). Su pico máximo de nacimientos se da a mediados de la primavera (~90 días de gestación), coincidiendo su periodo de lactancia con el inicio del periodo de lluvias (junio-julio), y efectuándose el destete durante la segunda mitad del verano o continuarse hasta que las crías adquieren la capacidad de volar (López-Wilchis, 1989) (Fig. 3).

Ahora bien, la reproducción recae en los individuos sexualmente maduros en quienes tanto la producción de gametos como el despliegue de su conducta de apareamiento, están relacionadas con la acción de las hormonas esteroides sexuales (HES) (Salame-Méndez *et al.*, 2005). Estas son moléculas que al actuar como mensajeras regulan diversos procesos de la fisiología de los vertebrados. Entre la HES producidas por el tejido intersticial o células de Leydig del testículo, y que tiene una relevante importancia en la biología reproductiva es la testosterona. En mamíferos, así como en algunas otras especies de vertebrados este andrógeno (tomado de Salame-Méndez *et al.*, 2005, 2003): i) regula la espermatogénesis y la función de los órganos accesorios -v. gr. glándulas seminales-; iii) estimula el crecimiento corporal modulando el desarrollo muscular y óseo; iv) participa en la manifestación de los caracteres sexuales secundarios como lo es el crecimiento y color del pelo; vi) regula el contenido de grasa en la piel, y vii) en conjunto con la progesterona y el estradiol coadyuva al despliegue del patrón de la conducta sexual de apareamiento. Su producción se lleva a cabo por vías biosintéticas bien establecidas en tejidos extragonadales y gonadales de diversas especies de vertebrados (Salame-Méndez *et al.*, 1998; Bentley, 1998; Gorbman *et al.*, 1983). Iniciándose con la biotransformación del colesterol en pregnenolona (P5), esteroide a partir del cual se producen las progestinas (v. gr. progesterona), andrógenos (v. gr. androstendiona y testosterona), estrógenos (v. gr. estradiol), y corticosteroides (glucocorticoides -cortisol- y mineralocorticoides -aldosterona-) (Norman y Litwack, 1997).

Con la finalidad de tener un parámetro endocrino referente a la biología reproductiva de *C. mexicanus*, en este trabajo se determinaron intermensualmente las concentraciones de progesterona, androstendiona, testosterona, y cortisol en heces de machos adultos. Metodología no invasiva a partir de la cual obtuvimos el perfil hormonal durante diferentes etapas del ciclo reproductivo tales como la espermatogénesis y el

apareamiento. Lo que permitió dilucidar su concordancia con el modelo reproductivo asincrónico en vespertilionidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio. “El Túnel” está situado en el límite sur de la Región Neártica enclavado en la Sierra de Tlaxco que comprende a la provincia fisiográfica del Eje Volcánico Transverso. Fue construido a principios del siglo XX atravesando de norte a sur al Cerro Huilapitzo, Tlaxco, Tlaxcala, México. Se localiza sobre la línea limítrofe entre los estados de Puebla y Tlaxcala, a 10 Km al este de Tlaxco a 3220 msnm, a los 19° 37' 14" de longitud N y 98° 02' 02" de longitud W (Fig. 2B).

El Túnel es una construcción en línea recta con una orientación norte-sur de aproximadamente 700 m de largo, 4 de altura y 2.5 m de ancho (Fig. 2B). Presenta un derrumbe aproximadamente en la parte media que obstruye el paso de un lado a otro, conformando dos túneles independientes: el “refugio principal” (lado sur) y el “refugio de maternidad” (lado norte).

El lado norte tiene una longitud de 270 m, estando los primeros 150 m, inundados, siendo el nivel del agua superior a los dos metros. Los 120 m restantes están libres de agua y derrumbes. Su lado sur tiene una longitud de 300 m que presenta un pequeño derrumbe a los 180 m y otro mayor a los 220 m. Este último prácticamente aísla a las dos cámaras restantes y solo permite el paso a las mismas mediante un pequeño orificio a través del cual con mucha dificultad puede pasar una persona. A los 180 m, a partir de la entrada, se encuentra una grieta en el techo por donde escurre agua, formándose por la acción de la misma, y por las filtraciones que se dan a todo lo largo, un par de canales que corren pegados a las paredes (López-Wilchis, 1989).

El clima del lugar en donde se encuentra El Túnel corresponde al tipo C(w2") bi que es el más húmedo de los templados sunhúmedos, con lluvias en verano, con verano fresco largo (García, 1981). Siendo la temperatura media anual -del mes más caliente-

entre 6.5° hasta y 22 °C; con una oscilación isothermal menor a 5 °C (Secretaria de la Presidencia, 1970). La marcha de la temperatura y la precipitación a lo largo del año corresponde a la de la estación climatológica de Tlaxco, Tlaxcala (López-Wilchis, 1989).

La vegetación circundante corresponde a un bosque de pino con oyamel, predominando en el estrato arbóreo *Pinus sp*; *Abies religiosa*, *Cupressus lindleyi* y *Arbutus sp*; en el estrato arbustivo predomina *Quercus rugosa* y en el estrato herbáceo *Tripsacum sp*; *Oxalis sp*; *Salvia microphylla* y *Cheilantes lendigera* (López-Wilchis, 1989).

Material Biológico. Las muestras de heces fecales fueron provenientes de individuos adultos de *Corynorhinus mexicanus* siendo recolectadas mensualmente (de febrero del 2003 a enero del 2004) en El Túnel. Para lo cual, a cada murciélago capturado y previo registro de sus medidas convencionales -peso, condición del epidídimo (vacío o lleno, retraído o distendido), posición de los testículos (abdominales o escrotados)- (Romero-Almaráz *et al.*, 2000; Kunz *et al.*, 1996; Ramírez-Pulido *et al.*, 1989), así como la asignación de su edad a partir del tamaño del brazo (López-Wilchis, 1989), se introdujo en un vaso de unicel al cual se le colocó una tapa perforada. Diez a quince minutos después se liberó, colocando sus heces en tubos Eppendorf conteniendo etanol al 70 %. Los tubos se almacenaron en refrigeración (4 °C) hasta el procesamiento de las heces para la valoración de los contenidos de hormonas esteroides.

Valoración de Hormonas Esteroides. Para determinar los contenidos en las heces de progesterona -P4-, androstendiona -A-, testosterona -T-, y cortisol -C- se realizaron los procedimientos descritos por Soto y col. (2004). Brevemente, de cada una de las muestras se tomaron 300-600 mg de heces siendo transferidas a un tubo cónico conteniendo agua bidestilada, siendo homogeneizadas manualmente. De cada uno de estos homogeneizados, se llevo a cabo la extracción total de esteroides (ETE). Este procedimiento, así como la valoración de su porcentaje de recuperación se hizo según Salame-Méndez y col. (2004). La ETE se llevo a cabo por duplicado con éter dietílico;

transfiriéndose la fase orgánica a tubos cónicos a los cuales se les evaporó a sequedad el disolvente orgánico. De muestras al azar de homogeneizados se les tomó una alícuota que se transfirió a un tubo cónico al cual se le agregaron ≈ 1000 - 1500 cpm de testosterona tritiada ($1,2,6,7,16,17$ - ^3H ; actividad específica 139 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) previamente purificada por cromatografía en capa fina utilizando tolueno:acetato de etilo ($2:1$, v/v). Este esteroide radiactivo fue utilizado como trazador para valorar el porcentaje de eficiencia en la extracción de los esteroides totales, siendo en promedio del 97.3 ± 0.6 %.

A cada uno de los tubos con su respectivo ETE se les agregó una disolución etanólica, almacenándose en refrigeración (4 °C). La cuantificación de las cuatro hormonas esteroides en cada muestra se hizo por inmunoensayo (siglas en inglés EIA) utilizando kits (Diagnostic Systems Laboratorios, Inc®. Webster, Texas). Para lo cual se siguieron las instrucciones mencionadas en cada uno, determinándose la concentración de cada hormona en un espectrofotocolorímetro (Microplate Reader, MR 600, Dynatech Product®).

Para comparar el contenido en las heces de P4, A, T, y C se hicieron análisis de varianza (ANDEVA) no paramétricas con una prueba de comparación múltiple de Tukey. Posteriormente, los meses se agruparon para conformar las estaciones del año: marzo, abril y mayo para la primavera; junio, julio y agosto el verano; septiembre, octubre y noviembre el otoño, y diciembre, enero y febrero para el invierno. Una vez conformadas las estaciones del año, se realizó la misma rutina que para los análisis intermensuales y así comparar cada hormona por estación. Los análisis se realizaron con las rutinas de GraphPrisma (Motulsky, 1999).

ACTIVIDADES REALIZADAS

- Recolecta mensual de las heces fecales de *C. mexicanus* en el Túnel, Tlaxco, Estado de Tlaxcala, México, de febrero del 2003 a enero del 2004.
- Procesamiento de las muestras para la determinación de los contenidos de hormonas esteroides (HE).
- Cuantificación de las HE en cada una de las muestras.
- Búsqueda bibliográfica relacionada con la biología reproductiva de quirópteros.
- Análisis, revisión, y discusión de los resultados.
- Revisión del manuscrito de Servicio Social.

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

El objetivo de este Servicio Social fue determinar intermensualmente los contenidos de HE (testosterona, progesterona, androstendiona, y cortisol) en las heces de machos adultos de *C. mexicanus*, especie de vespertilionido endémico de México. Lo cual permitió correlacionar con un enfoque endocrino, procesos de la actividad reproductiva tanto etológicos (apareamiento) como fisiológicos (espermatogénesis) de este quiróptero.

Por cuanto a las metas alcanzadas, se obtuvo la capacitación en la captura de murciélagos, el registro de diferentes parámetros tales como peso y edad, así como la recolección de las heces. Además el procesamiento de estas para la extracción y cuantificación de HE por la metodología de inmunoensayo. Lo cual permitió aprender el uso de los estuches y del equipo utilizado para tal efecto, como por ejemplo, del espectrofotocolorímetro.

Cabe resaltar, que los resultados obtenidos referentes al contenido de testosterona, fueron presentados en el VII Congreso Nacional de Mastozoología (ECOSUR, San Cristóbal de las Casas, Chiapas celebrado del 8 al 12 de noviembre del 2004) evento en el cual se obtuvo el segundo premio en la modalidad de cartel.

RESULTADOS

La P4 tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$) de enero a diciembre; de abril a mayo; mayo-junio ($P < 0.001$); junio-julio ($P < 0.001$), y de julio a agosto ($P < 0.001$) (Fig.4). Siendo el perfil mensual de esta hormona como sigue. Alcanza su máximo en el mes de junio; desciende de julio a agosto y tiende a incrementarse de septiembre a noviembre. Baja nuevamente en diciembre y vuelve a aumentar en enero, y desciende de febrero a abril, iniciando su incremento a partir del mes de mayo. Resaltando que los bajos contenidos observados en el gráfico (Fig. 4) se mantienen en cantidades detectables es decir, en concentraciones basales (0.04 ± 0.03 ng/gr = 40 ± 30 pg/gr).

Por estación del año el máximo se encuentra en verano, descendiendo en otoño, aumentando un poco para invierno y ascendiendo notablemente en primavera. Por estación del año, esta progestina no tuvo diferencias significativas ($P > 0.05$) (Fig. 5).

La A tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$) tan solo de abril a mayo y de junio a julio ($P < 0.001$) (Fig. 4). Siendo su máximo en el mes de mayo descendiendo a partir de junio. Posteriormente tendió a incrementarse de septiembre a octubre para disminuir nuevamente en noviembre. Aumentando en enero y volver a descender de febrero a abril; iniciándose su incremento a partir del mes de mayo (Fig. 4). Siendo los bajos contenidos observados en el gráfico su concentración basal (0.12 ± 0.12 ng/gr = 121.8 pg/gr).

El máximo se encuentra en primavera, disminuye de manera paulatina para verano y otoño. Incrementándose de manera poco considerable para invierno. Este andrógeno no tuvo diferencias significativas por estación del año ($P > 0.05$) (Fig. 5).

Por su parte, la T presentó diferencias significativas ($P < 0.001$) de mayo a junio y de julio a agosto (Fig. 4). Teniendo su máximo en el mes de junio, descendiendo a partir de julio, y manteniéndose en concentración basal de septiembre a abril (0.020 ± 0.13 ng/gr = 20 pg/gr). Estacionalmente la T tuvo diferencias significativas ($P < 0.001$) entre la primavera y el verano, así como entre el verano y el otoño (Fig. 5). Teniendo su máximo

en el verano, descendiendo para otoño y manteniéndose en cantidades basales en invierno, esto hasta iniciar nuevamente el aumento en primavera.

Para el contenido de C se tuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$) de abril a mayo, junio a julio, y julio a agosto (Fig. 4). Presentando en el mes de junio su mayor incremento, descendiendo en agosto, y volviendo a incrementarse de septiembre a noviembre ($1.38 \pm 0.27 \mu\text{g/gr} = 1380 \pm 270 \text{ ng/gr}$), descendiendo en diciembre para aumentar en mayo (Fig. 4). Constatándose que los bajos contenidos de esta hormona en el gráfico corresponden a sus concentraciones basales ($0.40 \pm 0.14 \mu\text{g/gr} = 400 \pm 140 \text{ ng/gr}$) (Fig. 5). Cabe resaltar, que el contenido de esta hormona esteroide fue significativamente mayor ($P > 0.05$) que las otras tres hormonas esteroides tanto que estuvo en un rango de magnitud mayor.

Por estación del año el cortisol presento su máximo en primavera, disminuyendo de manera paulatina de primavera a verano, de verano a otoño y de otoño a invierno. No habiendo diferencias significativas ($P > 0.05$) por estación del año (Fig. 5).

DISCUSIÓN

En quirópteros el contenido de P4 ha sido reportado solamente para las hembras de *Myotis lucifugus* y *Miniopterus schreibersii*, en donde se indica que las mayores fuentes de la progestina son los cuerpos lúteos y la placenta, seguidos por el tejido intersticial de los ovarios, y las glándulas adrenales (Crichton y Kruttsch 2000). Por lo tanto, haber detectado progesterona en las heces de los machos de *C. mexicanus*, es la primera evidencia que se tiene de su presencia en este sexo. El ser diferente el contenido de esta hormona a partir de abril y mayo, así como de mayo a junio, coincide con el inicio de la espermatogénesis y el crecimiento testicular, el cual se incrementa considerablemente de junio a agosto, meses en los que también son altos los contenidos de la progestina.

Referente al contenido de androstendiona, se sabe que en el plasma de *Pteropus poliocephalus* este andrógeno es mayor que el de testosterona, siendo ambos elevados en el verano tiempo durante el cual se incrementa el volumen de las glándulas accesorias. Por su parte, en el plasma de *Myotis septentrionalis* y *M. lucifugus* el contenido de esta hormona de baja androgenicidad es elevada durante la espermatogénesis, disminuyendo durante la hibernación y el almacenamiento de los espermatozoides. Por lo tanto, haber constatado en *C. mexicanus* que la androstendiona tuvo diferencias de abril a mayo, y de junio a julio, concuerda con el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis, así como con el crecimiento testicular.

Por su parte, el contenido de testosterona al incrementarse a partir de mayo, coincide con el inicio de la espermatogénesis y el crecimiento testicular. Alcanzando su mayor concentración en junio, mes en el que se da el incremento en el crecimiento testicular, el cual se mantiene así hasta el mes de agosto; mes en el que se registra el mayor crecimiento gonadal. Además durante este mes los espermatozoides ya se localizan en el epidídimo. Al iniciarse el descenso de la concentración de T a partir de julio coincide con la disminución en el tamaño de los testículos y sus túbulos seminíferos. Estos alcanzan su menor tamaño en el mes de noviembre tiempo en el cual también se da una baja en el contenido de T la cual se mantiene en niveles basales en los subsiguientes meses. Este patrón ha sido constatado en *Myotis lucifugus*, *Nyctalus noctula*, *Rhinolophus capensis*, *Eptesicus vulturinus* (in Crichton, 2000). Por lo tanto, el que estacionalmente este andrógeno fuese diferente de primavera a verano y de verano a otoño, sugiere que el verano es una parte aguas en la fisiología reproductiva de *C. mexicanus*. Durante la primavera se da el inicio del crecimiento testicular y la espermatogénesis, y durante el otoño se da la disminución de tamaño y cese de la espermatogénesis para dar paso a su actividad reproductiva.

Los contenidos de andrógenos tales como A y T en las heces de los machos de *C. mexicanus* pueden ser tanto de origen testicular como adrenal. En este sentido, se ha propuesto que los contenidos plasmáticos de andrógenos en megaquirópteros pueden ser de origen adrenal (Bardin *et al.*, 1988; Coffey, 1988) pero no así para microquirópteros (Racey y Tam, 1974; Racey 1974). Sin embargo, no se puede descartar que las adrenales sean una importante fuente de andrógenos tales como A y T, y de progestinas como la P4 que es el esteroide precursor para la biosíntesis de novo de A y T como se da en las glándulas suprarrenales (Norman y Litwack 1997). Lo anterior puede quedar demostrado a partir del hecho de que en *Pteropus policephalus* el contenido de T adrenal es significativamente mayor que el testicular (McGuckin y Blackshaw, 1991a). Además, cuando las concentraciones de esteroides son inusuales en murciélagos es decir, sus contenidos están muy por arriba de los denominados como rangos fisiológicos, posiblemente su fuente sean las glándulas suprarrenales (Pakes y Deanesley, 1965), por ejemplo, en un macho de *Myotis licifugus* se constató una concentración tan alta como de 2.2 µg/mg (pp 310 in Crichton, 2000). Esto último, podría explicar la razón por la cual la androstenediona fue el segundo esteroide con la mayor concentración en las heces de *C. mexicanus*.

El cortisol uno de los principales glucocorticoides, así como ser indicador del grado de estrés permitió constatar que durante finales de la primavera -abril y mayo- y durante el verano -de junio a agosto- su concentración tuvo diferencias significativas. Lo anterior sugiere que durante este tiempo los machos adultos de *C. mexicanus* tienen un mayor gasto energético y por ende ser alto su estrés. Lo anterior se postula, ya que durante este tiempo salen de su torpor, y se inicia tanto la espermatogénesis como el crecimiento testicular, que en conjunto implica un alto gasto energético. Por ejemplo, al salir de su estado de torpor tiene que cambiar su tasa metabólica debido a que inician a forrajear, así como su crecimiento testicular constatado a nivel gonadal. Por otro lado, el darse de

septiembre a noviembre incremento en la concentración de C la cual está en una concentración muy considerable ($1.38 \pm 0.27 \mu\text{g/gr} = 1380 \pm 270 \text{ ng/gr}$), así como en diciembre y febrero ($0.48 \pm 0.07 \mu\text{g/gr} = 480 \pm 70.71 \text{ ng/gr}$) puede atribuirse a que los machos adultos están estresados debido a que durante finales del otoño y el invierno se lleva a cabo el apareamiento. Por lo tanto, los machos deben estar alertas para lograr la cópula con el mayor número posible de hembras en celo y así asegurar su reproducción.

Por último, desde el punto de vista fisiológico y endocrino, el modelo reproductivo asincrónico descrito en vespertilionidos machos de *Myotis lucifugus*; *Nyctalus noctula*; *Vespadelus vulturnus*, y *Nyctophilus geoffroy* también se constata en *C. mexicanus*. Especie en la cual los contenidos de P4, A, y T se incrementan a partir de la primavera, tiempo durante el cual van saliendo de su torpor y se inicia el crecimiento del tamaño testicular; siendo su máximo a inicios del verano, tiempo en el cual son abundantes los espermatozoides, pero las glándulas accesorias aún no inician su crecimiento. Pero al disminuir los contenidos de las tres hormonas esteroides, quedando en concentraciones basales a partir del otoño, aumenta el tamaño de las glándulas accesorias y el de los epidídimos. Además de concordar estas bajas concentraciones con las cópulas que se dan durante el invierno, tiempo en que se estimula su libido (Fig. 6). Por lo tanto, *C. mexicanus* al tener un corto tiempo de almacenar espermatozoides en el epidídimo y tener una libido prolongada durante el invierno, así como ser diferentes los contenidos de hormonas esteroides en particular el de los andrógenos durante el desarrollo testicular y de las glándulas accesorias, apoyaría el que posee uno de los dos modelos reproductivos a partir de la actividad diferencial de las células de Leydig, que corresponde al modelo asincrónico (Gustafson, 1979; Kruttsch, 1975, 1961; Racey, 1974 y Tam, 1974) (Fig. 7).

Una explicación para el modelo asincrónico la dan Gustafson y Damassa (1987, 1984), quienes argumentan que durante la espermatogénesis las concentraciones de las SBG se incrementan reduciéndose así la cantidad de T libre. Mientras que cuando se da

el desarrollo de las glándulas accesorias disminuyen las SBG, resultando el que se incremente la T libre la cual estimularía el desarrollo de las glándulas accesorias. Sin embargo, una de las funciones de la testosterona es regular etapas de la espermatogénesis tales como la meiosis y el inicio de la espermiogénesis, por lo que si no hay T libre durante estas etapas ¿entonces como se explicarían estos procesos? Una explicación sería que la SBG con su esteroide ligado, por ejemplo testosterona, puede actuar como mensajero por medio de interaccionar con receptores membranales y así ejercer su acción por medio de un segundo mensajero tal como lo es el AMPc (Nakhla y Rosner, 1996; Fortunati *et al.*, 1996). Referente al desarrollo de las glándulas accesorias, puede deberse a otras moléculas de tipo androgénico tales como la dihidrotestosterona - DHT- que es una hormona proveniente de la reducción de la T, la cual actúa en la virilización de tejidos accesorios tales como las vesículas seminales (Salame-Méndez y Villapando-Fierro, 1998).

En conclusión, las cuatro hormonas cuantificadas, tres de las cuales están relacionadas con la fisiología reproductiva (A, T, y P4) y una de ellas (C) relacionada con el metabolismo e indicador del estado de estrés, permitieron tener un marco de referencia endocrino de la biología de *Corynorhinus mexicanus* especie de vespertilionido endémico de nuestro país, el cual se ajusta al modelo reproductivo asincrónico descrito para esta familia de quirópteros. Por lo tanto, valorar el contenido de hormonas esteroides en heces, es un método no invasivo es decir, no provoca estrés ni la muerte del individuo para valorar indicadores -v. gr. hormonas esteroides- de su fisiología, permitiendo además, correlacionar eventos endocrinos con procesos de la actividad reproductiva tanto etológicos (apareamiento) como fisiológicos (espermatogénesis).

CRITERIOS DE EVALUACIÓN

A partir de este Servicio Social se obtuvo capacitación en diferentes técnicas de campo y de laboratorio, lo cual permitió estudiar la biología reproductiva de un vespetilionido: *Corynorhinus mexicanus* especie endémica de México. Siendo evaluada a partir de presentar los avances para cumplir con las metas propuestas durante este trabajo, así como durante la discusión del material bibliográfico analizado. Lo anterior permitió presentar parte del trabajo en un foro académico (VII Congreso Nacional de Mastozoología), y se espera que con los datos obtenidos formen parte de publicaciones técnicas referentes a la biología reproductiva de la especie de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Bardin, C. W., C. Y. Cheng, N. A. Mustow and G. L. Gunsalus. 1988. The Sertoli cell. Pp. 933-974 In: Physiology of Reproduction (E. Knobil and J. D. Neil, eds.). Raven Press, New York.
- Bentley, P. J. 1998. Comparative Vertebrate Endocrinology. Third edition. Cambridge University Press.
- Coffey, D. S. 1988. Androgen action and the sex accesory glands. Pp 1081-1120 In: The Physiology of Reproduction (E. Knobil and J.D. Neil, eds.). Raven Press, New York.
- Crichton, E. 2000. Sperm storage and fertilization. Pp. 295-320. In: Reproductive Biology of Bats (Crichton, E. and P. Kruttsch, eds.). Academic Press. London.
- _____, and Kruttsch. P. (eds.). 2000. Reproductive Biology of Bats. Academic Press. London.
- Fortunati, N., F. Fissore, A. Fazzari, M. Becchis, A. Comba, M. G. Catalano, L. Berta and R. Frairia. 1996. Sex steroid binding protein exerts a negative control on estradiol

- action in MCF-7 cells (human breast cancer) through cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and protein kinase A. *Endocrinology* 137:686-692.
- Galindo-Galindo, C., A. Castro-Campillo, A. Salame-Méndez and J. Ramírez-Pulido. 2000. Reproductive events and social organization in a colony of *Anura geoffroyi* (Chiroptera: Phyllostomidae) from a Temperate Mexican Cave. *Acta Zool. Mex.* (n.s.) 80:51-68.
- García, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Talleres Larios, S.A. México.
- Gorbman, A., W. W. Dickhoff, S. R. Vigna, N. B. Clark and Ch. L. Ralph (eds.). 1983. Endocrine control of sexual reproduction. Chap 13. Pp. 451-516 In: *Comparative Endocrinology*. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. USA.
- Gustafson, A. W. 1979. Male reproductive patterns in hibernating bats. *J. Reprod. Fertil.* 56:317-331.
- _____, and M. Shemesh. 1976. Changes in plasma testosterone levels during the annual reproductive cycle of the hibernating bat, *Myotis lucifugus lucifugus*, with a survey of plasma testosterone levels in adult male vertebrates. *Biol. Reprod.* 16: 9-24.
- _____, and D. A. Damassa. 1984. Annual variations in plasma sex steroid-binding protein and testosterone concentrations in the adult male little brown bat: relation to the asynchronous recrudescence of the testis and accesory reproductive organs. *Biology of Reproduction* 33, 1126-1137.
- _____, and D. A. Damassa. 1987. Binding of sex steroids to plasma proteins: relations to androgen resistance and asynchronous reproductive patterns in hibernating bats. In *Recent advances in the Study of Bats* (M.B. Fenton, P.A. Racey and J.M.V. Rayner, eds), pp. 441-458. Cambridge University Press, Cambridge.

- Hall, E. R. 1981. The mammals of North America. John Wiley and Sons, New York, vol. 1. XV+600+90.
- Heideman, P. D., and K. S. Powell. 1998. Age specific reproductive strategies and delayed embryonic development in an old world fruit bat, *Ptenochirus jagori*. J. Mamm. 79:295-311.
- Hosken, D., M. Blackberry, T. Stewart and A. Stucki. 1998. The male reproductive cycle of three species of Australian vespertilionid bat. J. Zool. (London) 245:261-270.
- Koopman, K. F. 1974. Eastern limits of *Plecotus* in México. Journal of Mammalogy, 55: 872-873.
- Krutzsch, P. H. 1961. The reproductive in the male vespertilionid bat *Myotis velifer*. Anat. Record 139:309.
- _____. 1975. Reproduction of the Canyon bat, *Pipistrellus hesperus*, in Southwestern United States. Amer. J. Anat. 143: 163-200.
- _____. 1979. Male reproductive patterns in nonhibernating bats. J. Reprod. Fertil. 56: 333-344.
- _____, R. H. Watson and C. D. Lox. 1976. Reproductive biology of the male leaf-nosed bat, *Macrotus californicus*, in Southwestern United States. Anat. Record 184:611-636.
- Kunz, T. H. 1982. Roosting ecology of bats. In Ecology of Bats (T. H. Kunz, ed.), pp. 1-50. Plenum Press, New York.
- _____, C. Wemmer and V. Hayssen. 1996. Sex, age, and reproduction. Pp. 279-290 In: Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Mammals (Don E. Wilson, F. Russell Cole, James D. Nichols, Rasanayagam Rudran and Mercedes S. Foster, eds.). Smithsonian Institution Press. Washington and London.

- Kwiecienski, G. G., and D. A. Damassa. 2000. Peripheral endocrines in bat reproduction. Chapter. 3. Pp. 65-89 In: Reproductive Biology of Bats (Crichton, E. and P. Krutzsch, eds.). Academic Press. London.
- León-Galván M. A. 1997. Presencia de inhibidores de la lipoperoxidación en la secreción genital femenina del murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa. México.
- León-Galván M. A., T. Fonseca, R. López-Wilchis and A. Rosado. 1999. Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. Can. J. Zool. 77:7-12.
- López-Wilchis, R. 1989. Biología de *Plecotus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae) en el Estado de Tlaxcala, México. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México. 227 pp.
- Martín, L., and R. T. F. Bernard. 2000. Endocrine regulation of reproduction in bats: the role of circulating gonadal hormones. Chapter 2. Pp. 27-64 In: Reproductive Biology of Bats (Crichton, E. and P. Krutzsch, eds.). Academic Press. London.
- McGuckin, M. A., and A. W. Blackshaw. 1991. Seasonal changes in testicular size, plasma testosterone concentration and body weight in captive flying-foxes, *Pteropus poliocephalus* and *P. scapulatus*. J. Reprod. Fertil. 92:339-346.
- Motulsky, H. J. 1999. Analizing data with GraphPad Prisma Software, Inc. San Diego, CA. USA.
- Nakhla, A. M., and W. Rosner. 1996. Stimulation of prostate cancer growth by androgens and estrogens through the intermediacy of sex hormone-binding globulin. Endocrinology 137:4126-4129.
- Norman A., and G. Litwack. 1997. Hormones. Second edition. Academic Press, San Diego, CA. USA.

- Pakes, A. S., and R. Deanesly. 1965. Relation between the gonads and the adrenal glands. Pp. 1064-1111 In: Marshall's Physiology of Reproduction (Vol. III) (A. S. Parkes, ed.). Lonmans, London.
- Racey, P. A. 1974. The reproductive cycle in male noctule bats, *Nyctalus noctula*. J. Reprod. Fertil. 41:169-182.
- _____, and W. H. Tam. 1974. Reproduction in male *Pipistrellus pipistrellus* (Mammalia: Chiroptera). J. Zool. (London) 172:101-122.
- Ramírez-Pulido J., M. A. Armella and A. Castro-Campillo. 1993. Reproductive patterns of three neotropical bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in Guerrero, México. Southwestern Nat. 38(1):24-29.
- _____, I. Lira, S. Gaona, C. Müdespacher y A. Castro. 1989. Manejo y Mantenimiento de Colecciones Mastozoológicas. UAM-Iztapalapa. México. 127 pp.
- Romero-Almaráz, M. L; C. Sánchez-Hernández, C. García-Estrada y R. D. Owen. 2000. Mamíferos Pequeños: Manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio. UNAM-UAEM. México. 151 pp + 6 IV.
- Salame-Méndez A., y Villalpando-Fierro. 1998. La diferenciación sexual en vertebrados: hipótesis y teorías. Acta Zool. Mex. (n. s.) 73 89-110.
- _____, J. Herrera-Muñoz, A. Castro-Campillo y J. Ramírez-Pulido. 2003. Valoración de esteroides sexuales en testículos de ratones juveniles de *Peromyscus melanotis* (Rodentia: Muridae). Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. (3ª época) 1:83-90.
- _____, R. Viguera-Villaseñor, A. Castro-Campillo, J. Herrera-Muñoz, E. Mendieta-Márquez y J. Ramírez-Pulido. 2005. Descripción del perfil ontogénico de hormonas esteroides sexuales e intermediarios en testículos del ratón de orejas negras (*Peromyscus melanotis*, Allen y Chapman, 1987). Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. (3ª época) 2: en prensa.

- _____, A. Castro Campillo, I. Salgado-Ugarte, E. Mendieta-Márquez, J. Herrera-Muñoz y J. Ramírez-Pulido. 2005. Evaluación estacional de la producción de esteroides sexuales en testículo del ratón de orejas oscuras (*Peromyscus melanotis*, Allen y Chapma, 1987) de diferentes clases de edad. *Acta Zool. Mex.* (ns) 20:103-114.
- Soto, A., A. Salame-Méndez, J. Ramírez, L. Yáñez y M. Armella. 2004. Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo Mexicano (*Canis lupus bailey*) en Cautiverio. *Acta Zool. Mex.* (n.s.) 20(2):187-196.
- Tideman, C. R. 1993. Reproduction in the bats *Vespadelus vulturnus*, *V. regulus* and *V. darlingtoni* (Microchiroptera: Vespertilionidae) in coastal south-eastern Australia. *Australian J. Zool.* 41:21-35.
- Tumilson, R. 1992. *Plecotus mexicanus*. *Mammalian Species* 401:1-3.
- Wimsatt, W.A. 1960. Some problems of reproduction in relation to hibernation in bats. *Bulletin of the Mussen of Comparative Zoology of Harvard University* 124, 249-267.
- _____, 1969. Some interrelations of reproductions of and hibernation in mammals. *Simposium of the Society of Experimental Biology* 23, 511-549.
- _____, 1979. Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *Journal of Reproduction and Fertility* 56, 345-357.

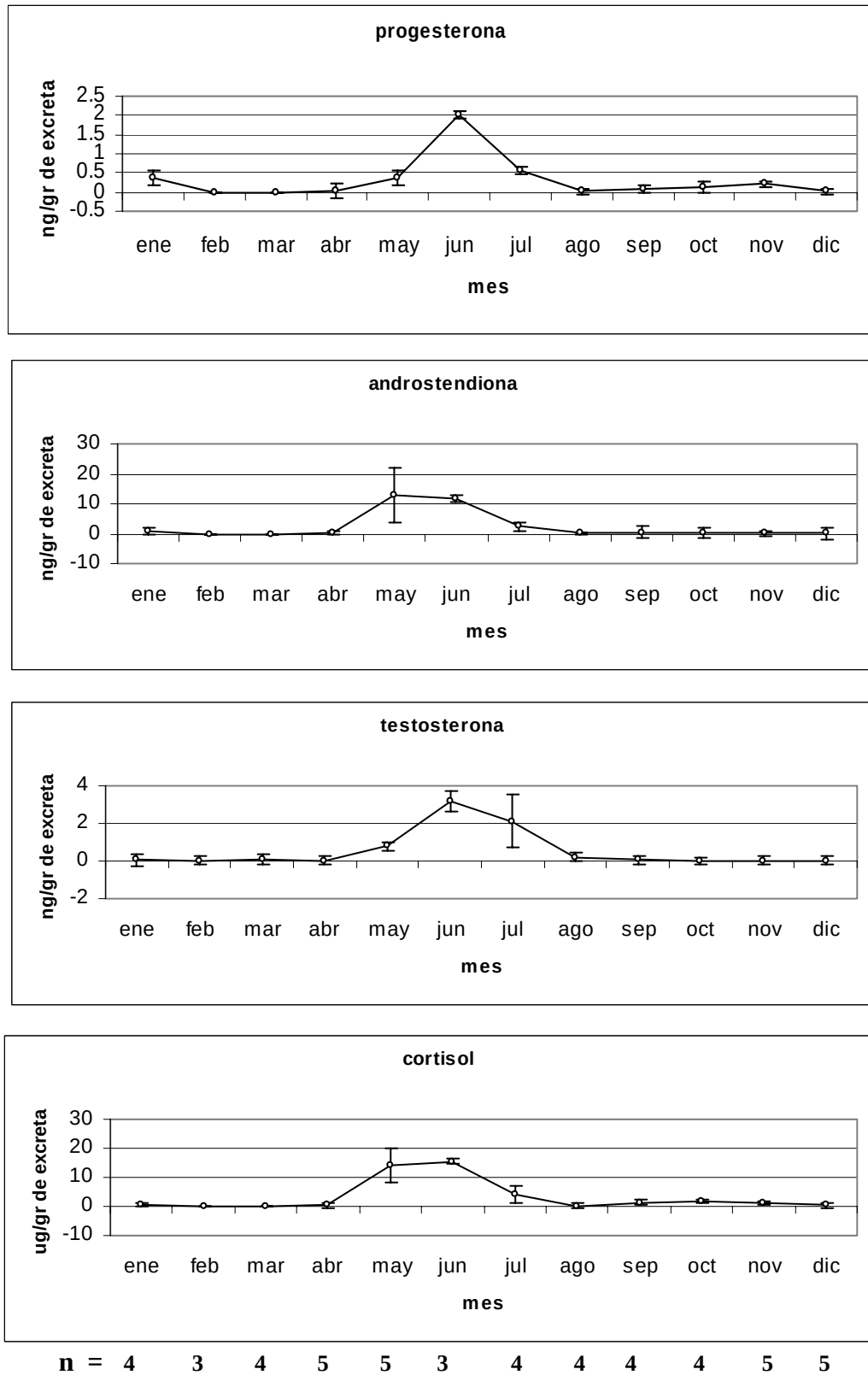


Fig. 4. Contenido intermensual de hormonas esteroides en las heces de machos adultos de *Corynorhinus mexicanus*. Las líneas verticales representan $\pm$ una desviación estándar, y la **n** corresponde al número de individuos analizados.

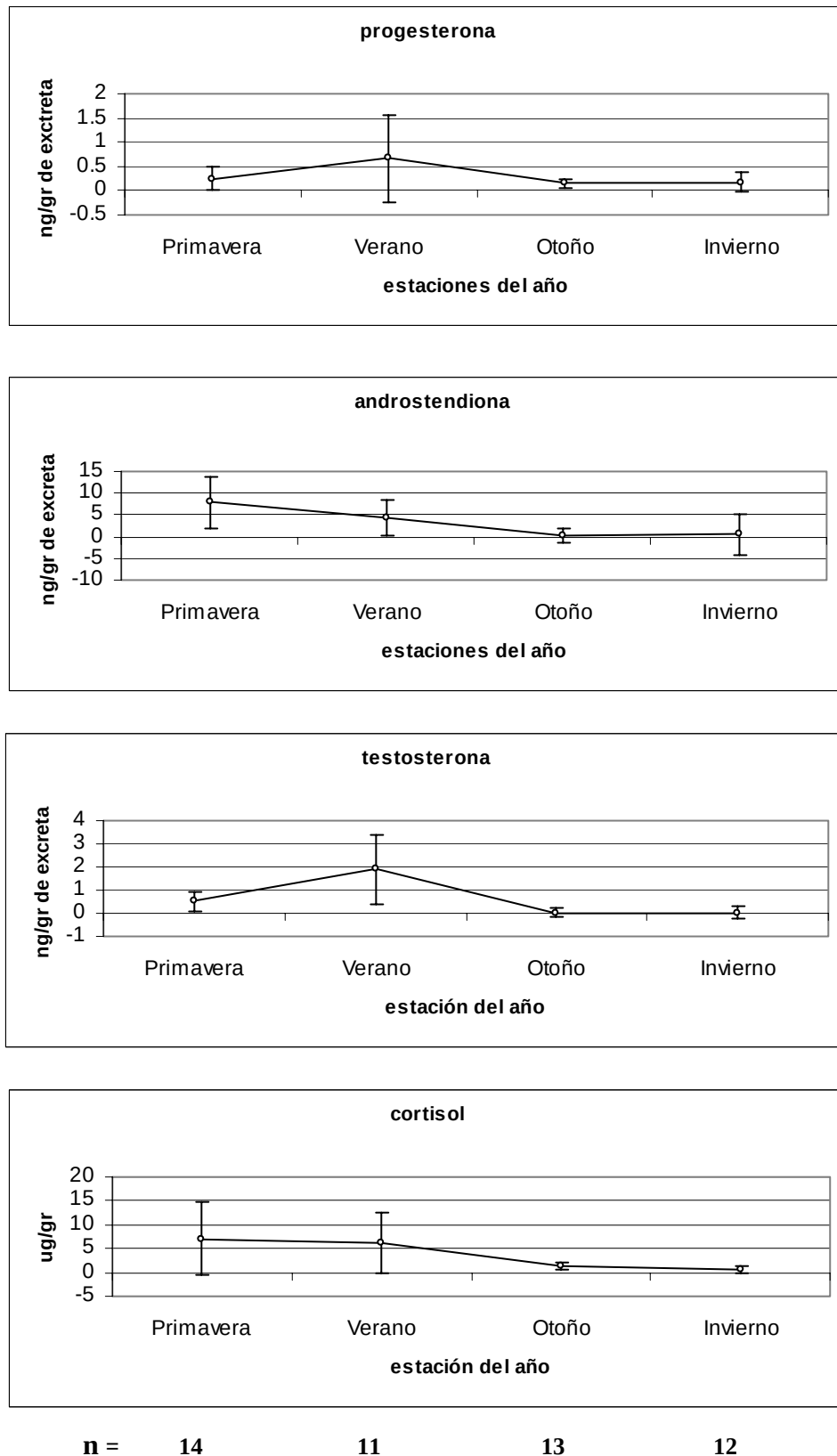


Fig. 5. Contenido de hormonas esteroides en las heces de machos adultos de *Corynorhinus mexicanus* por estación del año. Las barras representan más menos una desviación estándar y la n corresponde al número de individuos analizados.

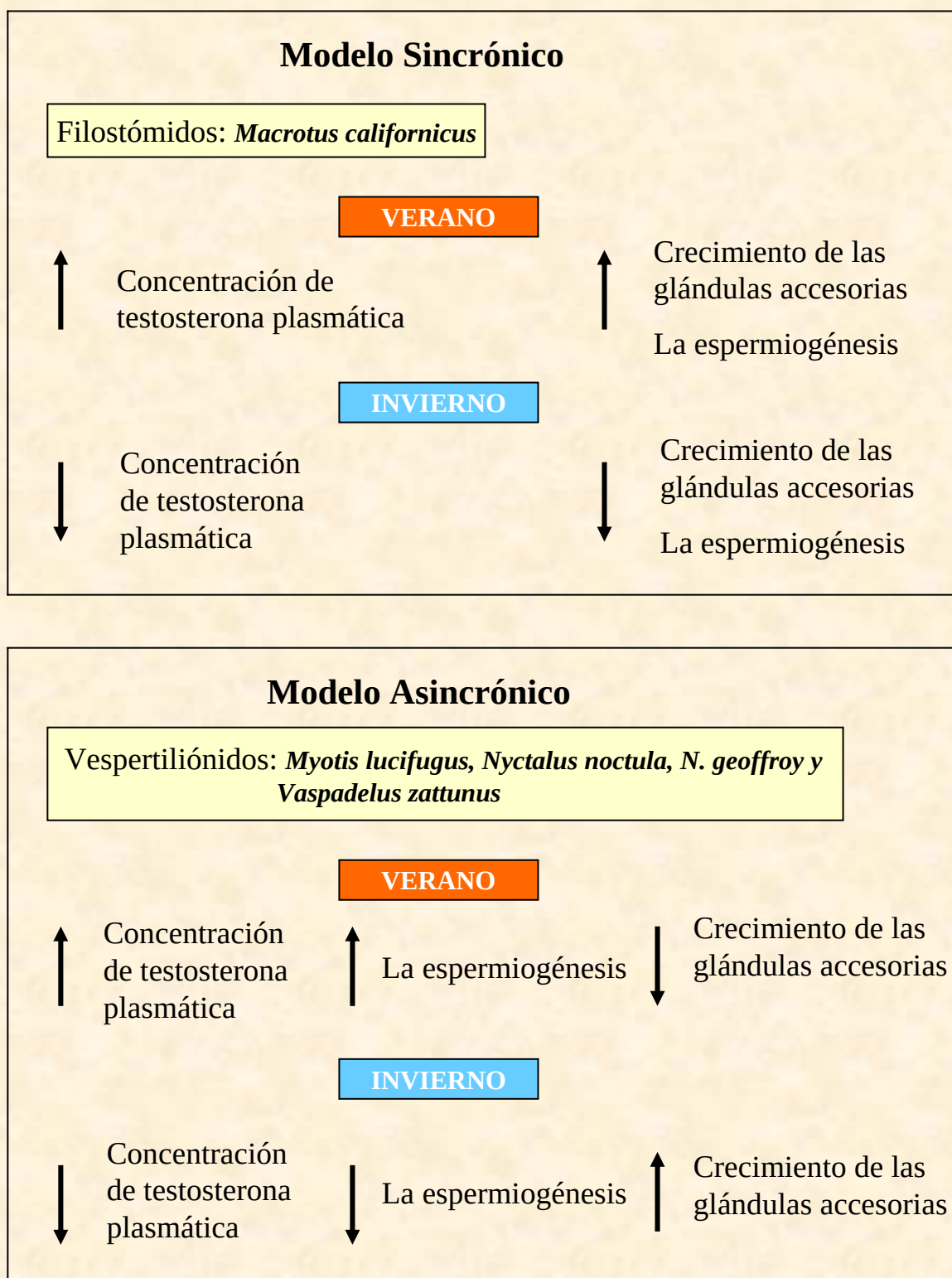


Fig. 1. Representación de los modelos reproductivos descritos para filostómidos y vespertilionidos a partir de correlacionar eventos de su fisiología reproductiva con el contenido de testosterona en el plasma. La dirección de las flechas indican aumento o decremento (Basado en L. Martin y R. T. F. Bernard, 2000; G. G. Kwiecinski y D. A. Damassa, 2000) .

**Modelo
Asincrónico**

Vespertiliónidos

*Miotis lucifugus, Nyctalus noctula, N.
geoffroy y Vaspadelus zattunus*

VERANO

↑
Concentración de
testosterona
plasmática

↑
La espermatogénesis

↓
Crecimiento de las
glándulas accesorias

INVIERNO

↓
Concentración de
testosterona
plasmática

↓
La espermatogénesis

↑
Crecimiento de las
glándulas accesorias

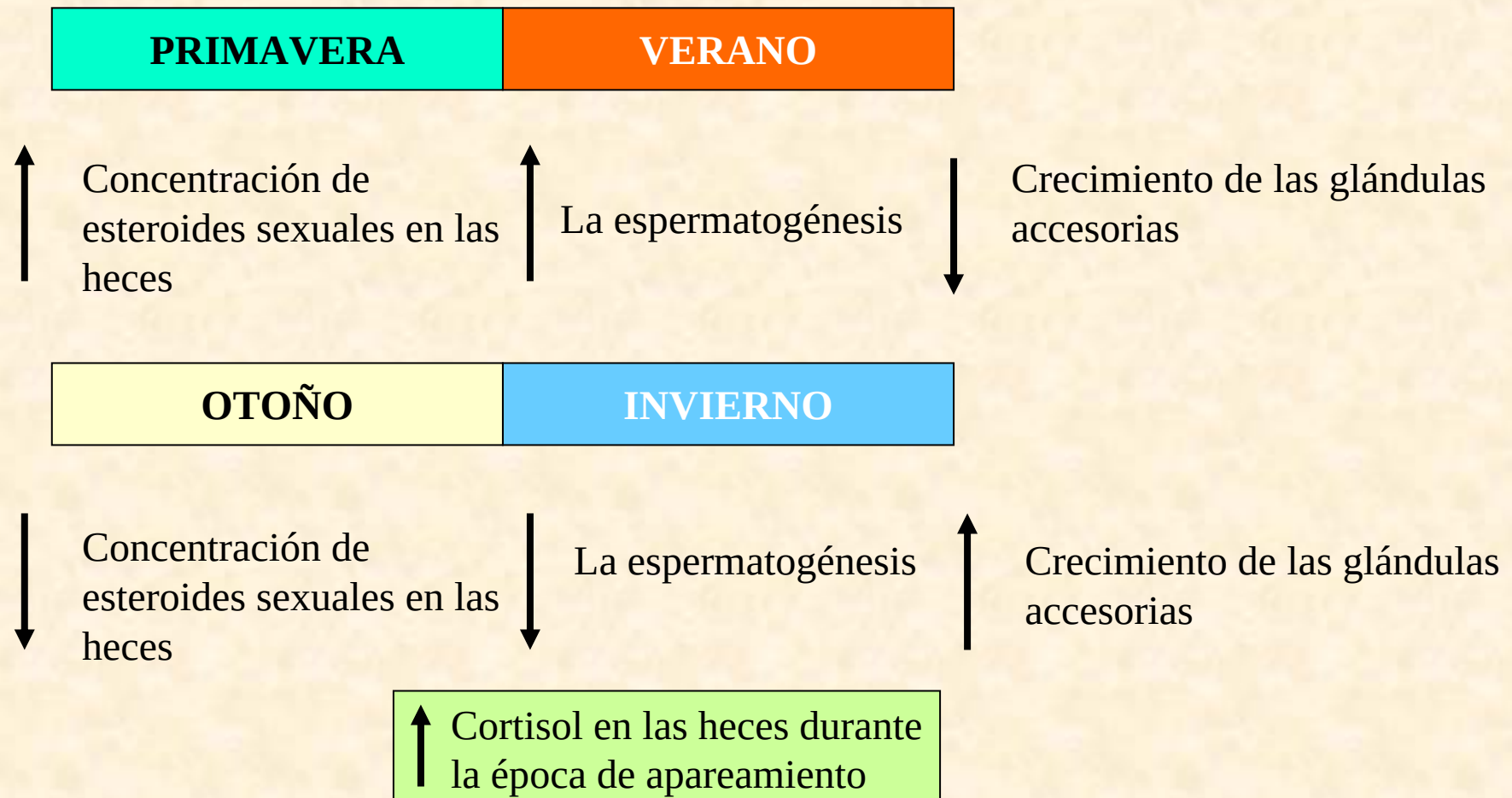


Fig 7. Representación del modelo asincrónico correspondiente a vespertilionidos al cual se ajusta *Corynorhinus mexicanus*, a partir de integrar algunos de sus eventos fisiológicos y endócrinos de su biología reproductiva. La dirección de las flechas indican aumento o decremento.

PRIMAVERA

VERANO

OTOÑO

INVIERNO

Marzo-Mayo

Nacimiento
Lactancia

Agosto

Máximo crecimiento
testicular

Noviembre

Abundantes
espermatozoides
en el epidídimo

Disminución de la
espermioogénesis

Diciembre-Enero

Máximo
crecimiento de
epidídimos y
glándulas
acesorias

Túbulos
seminíferos
constreñidos
Apareamiento
Gestación

Las concentraciones de hormonas
esteroides aumentan en las heces y
alcanzan sus máximos

Las concentraciones de hormonas esteroides en
las heces van disminuyendo hasta mantenerse en
cantidades basales pero aumentan las de cortisol

Fig. 6. Correlación de los resultados obtenidos en este trabajo, referentes al contenido de hormonas esteroides en las heces de machos adultos de *Corynorhinus mexicanus* con sus eventos reproductivos en la localidad de “El Túnel”, Tlaxcala, México.

PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
Marzo-Mayo Nacimiento Lactancia	Agosto Máximo crecimiento testicular	Noviembre Abundantes espermatozoides en el epidídimo Disminución de la espermiogénesis	Diciembre-Enero Máximo crecimiento de epidídimos y glándulas accesorias Túbulos seminíferos constreñidos Apareamiento Gestación

Fig. 3. Eventos reproductivos de una colonia de *Corynorhinus mexicanus* en la localidad de “El Túnel”, Tlaxcala, México (Basado en López-Wilchis, 1989).