

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

PARTICIPACIÓN DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS
DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS EN EL MURCIÉLAGO
CORYNORHINUS MEXICANUS (CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE).

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA

M. en B. R. A. MIGUEL ANGEL LEÓN GALVÁN

Comité tutorial

Tutor Dr. Ricardo López Wilchis

Asesor Dr. Adolfo Rosado García

Asesor Dr. Omar Hernández Pérez

Octubre de 2008

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en B. R. A. MIGUEL ANGEL LEÓN GALVÁN

El día 13 de octubre de 2008

Miembros del jurado:

Director: Dr. Ricardo López Wilchis _____

Asesor: Dr. Adolfo Rosado García _____

Asesor: Dr. Omar Hernández Pérez _____

Sinodal: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor _____

Sinodal: Dr. José Miguel Betancourt Rule _____

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

DR. RICARDO LÓPEZ WILCHIS

INVESTIGADOR TITULAR “C”

INVESTIGADOR NACIONAL NIVEL I

ASESOR

DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA

INVESTIGADOR TITULAR “C”

INVESTIGADOR DISTINGUIDO UAM

INVESTIGADOR NACIONAL EMERITO

ASESOR

DR. OMAR HERNÁNDEZ PÉREZ

INVESTIGADOR TITULAR “C” UAM

INVESTIGADOR TITULAR “A” IMSS

AGRADECIMIENTOS

Obtener el grado de Doctor es un éxito personal al que se llega como resultado de la realización de grandes esfuerzos y dedicación permanente, para concluir los estudios propios de una carrera académica. Pero, para realizar un recorrido exitoso por una carrera académica, es necesario el apoyo de instituciones y de personas, enlazados y estimulados todos, por un fin básico común, la obtención de conocimientos.

Es por ello, que deseo expresar mis mas sinceros agradecimientos a las siguientes instituciones: el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Universidad Autónoma Metropolitana.

Y con especial énfasis a las siguientes personas:

Al Dr. Ricardo López Wilchis, por ofrecerme su apoyo de una manera incondicional.

Al Dr. Adolfo Rosado García, por señalarme una ruta encaminada hacia el conocimiento.

Al Dr. Omar Hernández Pérez, por compartirme su experiencia y mostrarme que los éxitos se alcanzan con disciplina.

A la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor y al Dr. Miguel Betancourt Rule, por favorecer mejoras a este trabajo, a través de sugerencias y recomendaciones.

Al Dr. Mario García Lorenzana y a la Dra. Marcela Vergara, por su asesoría en la aplicación del método histológico.

Al Dr. Jorge Antonio Sosa Melgarejo, Por su asesoría en el análisis por medio de microscopia confocal.

Al Dr. Isaías Hazarmabeth Salgado Ugalde, por su asesoría en el análisis estadístico.

A los Maestros José Williams Torres Flores y Luis Manuel Guevara Chumacero, a la M.V.Z. Rosa María Aguilar Muñoz y en general a la familia Armas del poblado de Tecomalucan, Tlaxco, estado de Tlaxcala, por su apoyo en la realización del trabajo de campo.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres: Jesús Carlos León Sada, y María de la Luz Galván Mejía, por ofrecerme su cariño durante una vida.

A mi esposa Antonieta Elizabeth Sosa Lima, por ser el cariño que me acompaña siempre.

A mis hijos Isaac Miguel y Angelica León Sosa, por que su constante inquietud en conocer y entender su entorno, me estimula para no perder mi propio interés en el conocimiento de un entorno más amplio.

RESUMEN

En los mamíferos estacionales el ciclo reproductivo masculino es caracterizado por fases de recrudescencia y de regresión testicular, que delimitan el periodo de actividad de espermatogénesis. A través del paso por estas fases, la masa testicular se modifica entre un 40% y un 90%, dependiendo de la especie, debido principalmente a factores como: cambios en el tamaño de las células somáticas, la proliferación y la eliminación de células germinales. Para los mamíferos en general, hay eliminación de células germinales por apoptosis durante la espermatogénesis, estudios realizados en un pequeño número de especies estacionales, indican que el índice de apoptosis es menor durante la recrudescencia del testículo y el periodo de espermatogénesis, con respecto a la fase de regresión testicular. *Corynorhinus mexicanus* es un murciélago estacional del que se tiene un conocimiento general sobre su reproducción; en particular, presenta un único y asincrónico ciclo de actividad al año. La recrudescencia e involución testicular ocurren en primavera-verano y conllevan marcados cambios en el tamaño de los testículos; mientras que los cambios correspondientes del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias ocurren en otoño-invierno, lo que convierte a éste quiróptero en un interesante modelo para investigar en de especies estacionales, la participación que tiene la apoptosis en las diferentes fases de desarrollo de los testículos durante el ciclo reproductivo. Los objetivos del presente trabajo fueron: precisar el patrón reproductivo masculino del murciélago *C. mexicanus*, con base en el registro de los cambios morfométricos de los órganos sexuales a través del ciclo anual y, determinar la participación de la apoptosis en relación a los cambios macroscópicos e histológicos del testículo durante el ciclo reproductivo en los individuos. En esta especie, los testículos permanecen en posición inguinal permanentemente.

El periodo activo de la espermatogénesis comprende en promedio 5 meses y medio, con la etapa de receso de noviembre a abril. El crecimiento testicular reinicia en mayo-junio, cuando ocurre principalmente la fase proliferativa de la espermatogénesis. En julio hay actividad meiótica y el área del lumen tubular comienza a incrementar. En agosto, la espermatogénesis es completa, el área del lumen es máxima y el peso testicular aumenta ≈ 40 veces. La espermiogénesis y la espermiación fueron observados de agosto a octubre. En septiembre inicia la involución testicular, ya que el diámetro tubular y el número de células germinales por sección transversal del túbulo seminífero disminuyen. El número de células intersticiales presentó ligeros cambios temporales, siendo mayor de junio a septiembre que en el resto de los meses del año. Células en apoptosis fueron detectadas en ambos compartimentos (intersticial y tubular) del testículo, exclusivamente durante los meses de junio-septiembre. El índice de apoptosis fue mayor en junio con respecto a los valores registrados para los meses de julio a septiembre. Los resultados de este trabajo permiten considerar que en el *C. mexicanus*, la ausencia de evidencias de apoptosis en los tejidos testiculares de mayo, señalan hacia una regulación positiva para la proliferación celular al reinicio de la espermatogénesis y del crecimiento testicular. El mayor índice de apoptosis registrado en junio parece establecer un determinado cociente numérico entre células de Sertoli y células germinales para el adecuado avance de la espermatogénesis. Eliminación de células germinales por apoptosis solo se presentó en la fase temprana de la involución testicular; mientras que, para que se lleve a cabo involución completa, es necesario además, la participación conjunta de: el cese de la actividad proliferativa de las células germinales, la espermiación y el cierre del lumen tubular.

ABSTRACT

The male reproductive cycle of seasonal mammals is characterized by phases of testicular recrudescence and regression, which surround the activity period of spermatogenesis. Through the passage through these phases, the testicular mass become modified between 40% and 90%, depending on the species, mainly due to factors such as changes in the size of somatic cells, proliferation and elimination of germ cells. For mammals in general, there is elimination of germ cells by apoptosis during spermatogenesis, studies conducted in a small number of seasonal species, indicate that the rate of apoptosis is lower during the recrudescence of the testis and the period of spermatogenesis, regarding to the phase of testicular regression. *Corynorhinus mexicanus* is a seasonal bat, which has a general knowledge about its reproduction, in particular, presents a unique and asynchronous cycle of activity annually. The testicular recrudescence and involution occur in the spring-summer and involve marked changes in the size of the testicles, while the corresponding changes in the epididymides and the accessory sex glands occur in autumn-winter, making it an interesting model in bats to investigate participation that has apoptosis at different stages of development of the testicles during the reproductive cycle of seasonal species. The objectives of this study were to clarify the male reproductive pattern of *C. mexicanus* bat, based on the registration of morphometric changes of the sexual organs through the annual cycle and, to determine the involvement of apoptosis in relation to macroscopic and histological changes of testis during the reproductive cycle in individuals. In this species, the testes remain in groin position permanently. The active period of spermatogenesis takes place in an average of 5 months and a half, with the stage of recess from November to April. Testicular growth restarts in May-June, when the proliferative

phase of spermatogenesis is mainly occurring. In July there is meiotic activity and the tubular lumen area begins to increase. In August, full spermatogenesis occurs, the area of the lumen is greatest and the testicular weight increases ≈ 40 times. Spermiogenesis and spermiation were observed from August to October. Testicular involution starts in September, as the diameter of the tubules and the number of germ cells by transversal section of seminiferous tubule diminish. Slight changes in the number of interstitial cells were observed through the months, being higher in June-September than in the other months of the year. Cells in apoptosis were detected in both compartments (interstitial and tubular) of the testicles, only during the period of June-September. The apoptotic index was higher in June regarding to the corresponding values for July to September. The results of this study allow us to consider that, in *C. mexicanus* bat, the absence of apoptosis evidence in testicular tissues in May, point towards a positive regulation to cell proliferation, in order to the resumption of spermatogenesis and testicular growth. The highest apoptotic index in June appears to establish a specific ratio between the number of Sertoli cells and germ cells, for the proper progress of spermatogenesis. Elimination of germ cells by apoptosis is introduced only in the early stage of testicular involution, while, to be carried out complete involution, it is also necessary, the joint participation of: cessation of proliferative activity of germ cells, spermiation and closure of the tubular lumen.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
INTRODUCCION.....	1
I- Aspectos de la reproducción en los murciélagos de zonas frías.....	1
I.1. Patrones reproductivos masculinos.....	1
I.2. Espermatogénesis.....	4
II- Patrón reproductivo masculino del murciélago <i>Corynorhinus mexicanus</i>	5
III- Cambios macro- y microestructurales del testículo en mamíferos con reproducción estacional.....	6
IV- La apoptosis en células del testículo.....	8
IV.1. Generalidades de la apoptosis.....	8
IV. 2. Implicaciones de la ejecución normal y la estimulación anormal de la apoptosis en el desarrollo y función del testículo.....	10
IV.3. Apoptosis en el testículo de mamíferos con reproducción estacional.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS	15
I- Trabajo de campo (Captura y selección de los animales de estudio).....	15
II- Trabajo de laboratorio.....	16
II.1. Obtención de los tractos reproductores y preparación de los órganos sexuales.....	16

II.2. Estimación de la condición corporal de los murciélagos.....	17
II.3. Procesamiento histológico de los testículos.....	18
II.4. Procesamiento histoquímico de los tejidos testiculares para la detección de apoptosis.....	20
II.5. Reactivos y soluciones empleadas.....	22
III- Análisis estadístico.....	23
RESULTADOS.....	24
I- Estatus de edad, condición corporal y reproductiva de los murciélagos	
<i>Corynorhinus mexicanus</i>	24
II- El ciclo de cambios histológicos del testículo, incluyendo la espermatogénesis...	30
III- Índice de apoptosis en los tejidos testiculares durante el ciclo reproductivo.....	35
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA	80
DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	96

**PARTICIPACIÓN DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS DURANTE LA
ESPERMATOGÉNESIS EN EL MURCIÉLAGO *CORYNORHINUS MEXICANUS*
(CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE).**

INTRODUCCIÓN

I- Aspectos de la reproducción en los murciélagos de zonas frías.

I.1. Patrones reproductivos masculinos.

Entre las especies que conforman el Orden Chiroptera, los individuos del sexo masculino despliegan distintos patrones generales de reproducción, reconocidos con base en el número de ciclos reproductivos y en la temporalidad con que estos se presentan a lo largo de un periodo anual. Uno de esos patrones generales es propio de las especies cuya actividad reproductiva ocurre de manera continua (en concordancia con más de dos ciclos estrales anualmente). En otro patrón general, que es donde se ubica a la mayoría de las especies conocidas, la reproducción está delimitada estacionalmente, dentro de esta diferente modalidad existen dos categorías particulares; una de las cuales es propia de murciélagos en los que, la recrudescencia y la involución testicular se llevan a cabo en un esquema bimodal (en relación con la poliestría bimodal de las hembras). En la segunda categoría se incluye a las especies que presentan un solo periodo de actividad testicular por año (coincidiendo con el

patrón monoéstrico de las hembras). Esta última categoría es observada principalmente en los mamíferos que habitan en regiones de clima frío.

En las zonas frías, la disminución de la temperatura ambiental durante la temporada invernal provoca la reducción en el tamaño de las poblaciones de insectos, que son la base de la alimentación para la mayoría de las especies de quirópteros habitantes de esos lugares. La disminución en la disponibilidad de alimento y la baja temperatura ambiental, son factores que en conjunto ejercen un efecto directo sobre los murciélagos, y solo ciertas especies están adaptados para responder a estos factores ejecutando una conducta de aletargamiento fisiológico, cuya duración varía de acuerdo con la intensidad de las condiciones desfavorables y con la especie (1).

Varias de las especies que llevan a cabo un aletargamiento, el periodo de hibernación está separado de la temporada de reproducción, tal es el caso los quirópteros europeos del género *Miniopterus*, en quienes los apareamientos terminan antes de entrar en hibernación, mientras que la espermatogénesis comienza en la primavera siguiente (2). En contraste, en otros miembros de las familias Vespertiliónidae y Rhinolophidae, la temporada de reproducción se extiende hasta el periodo cuando ocurre el torpor invernal, por lo que el aletargamiento tiene una marcada influencia sobre la fisiología reproductiva de los individuos, propiciando la existencia de un patrón reproductivo masculino inusual, caracterizado por una asincronía temporal entre las funciones sexuales (3, 4). La actividad espermatogénica reinicia en la primavera, alcanza su pico a mediados o al final del verano y decrece súbitamente, quedando

al poco tiempo, en una condición de inactividad total. Por otra parte, los órganos sexuales secundarios (el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias) de esos murciélagos, experimentan recrudescencia tardíamente, alcanzan su máximo desarrollo y se encuentran repletos de espermatozoides (la región caudal del epidídimo) o de secreciones (las glándulas sexuales), durante el periodo de otoño-invierno cuando se llevan a cabo los apareamientos y los individuos entran en estado de torpor (3). Al finalizar la temporada de letargo en los murciélagos, los órganos sexuales secundarios experimentan una completa regresión; entonces los individuos pasan por un breve periodo de tiempo en una condición de receso sexual, hasta que es reiniciada la actividad testicular en la primavera (3).

En los murciélagos hibernantes con patrón reproductivo masculino asincrónico, las evidencias morfológicas del tejido intersticial del testículo, señalan que, de manera común, las células de Leydig muestran características morfológicas indicativas de actividad durante el periodo de espermatogénesis (2); mientras que, en la fase de involución se han observado dos maneras que difieren en tiempo. En algunas especies, la involución completa de las células de Leydig ocurre al inicio del periodo de apareamiento (que se traslapa con el periodo de hibernación) o bien probablemente se mantienen en un nivel bajo de actividad durante el resto del periodo de apareamiento (2). En otras especies, las células de Leydig se mantienen desarrolladas o con una ligera reducción en su actividad durante el periodo de apareamiento e hibernación y la involución completa se presenta en la primavera, seguido de que los animales han terminado la hibernación (2).

1.2. Espermatogénesis.

En la mayoría de los murciélagos insectívoros que habitan en zonas frías, la espermatogénesis corresponde con el pico en la disponibilidad de insectos durante la mitad del verano y puede ser afectada por la condición corporal (5). La variación estacional de la espermatogénesis involucra una etapa de recrudescencia y otra de profunda involución de los túbulos seminíferos, y en algunas especies la migración de los testículos hacia el canal inguinal (3). Si bien la androgénesis (a niveles bajos) y las funciones reproductivas secundarias son mantenidas durante el invierno (3, 6), la espermatogénesis no puede proceder durante el periodo cuando la tasa metabólica de reposo está persistentemente deprimida y el aletargamiento es prolongado, por lo que hay una disociación entre la espermatogénesis y la hibernación (4). Aún en áreas tropicales la espermatogénesis se interrumpe o es suprimida durante los meses más fríos y secos (7), e inclusive es retardada durante el verano cuando ciertas especies de murciélagos recurren al torpor diario debido a una disminución considerable de la temperatura ambiental (8, 9).

Comparada con otros mamíferos de talla semejante, los murciélagos de zonas frías tienen periodos de espermatogénesis más largos, ya que normalmente transcurren de tres a cuatro meses entre los primeros signos de crecimiento en los túbulos seminíferos y la liberación de los espermatozoides del epitelio seminífero y el subsiguiente llenado del epidídimo con espermatozoides maduros (3). Debido a que durante el periodo actividad reproductiva, en algunas especies de murciélagos se presenta un incremento de hasta cuarenta veces en la masa testicular (10, 11), se ha considerado que la larga duración de la espermatogénesis en los

murciélagos puede deberse a los altos costos de la energía involucrada en el crecimiento de los testículos y las glándulas sexuales accesorias (4); sin embargo, son escasos los estudios que permiten identificar los componentes del testículo que determinan ese enorme incremento en la masa.

II- Patrón reproductivo masculino del murciélago *Corynorhinus mexicanus*.

El murciélago *Corynorhinus mexicanus*, especie objeto del presente estudio, es un vespertiliónido insectívoro que habita las partes mas altas y húmedas de los principales sistemas montañosos de México (12); es un hibernante facultativo y solo pasa por fases diarias de torpor mas o menos profundo durante el periodo de hibernación (13).

Corynorhinus mexicanus cuenta con un patrón reproductivo masculino de tipo asincrónico (13, 14, 15), semejante en términos generales, al descrito para otros murciélagos plecotínidos de zonas frías con los que se encuentra estrechamente relacionado filogenéticamente. Tal es el caso de *C. townsendii* (16) y de las especies Paleárticas *Plecotus auritus* (9, 17) y *P. austriacus* (17), pero estos plecotínidos son hibernantes profundos, por lo que difieren con respecto a *C. mexicanus*, en cuanto al momento del año en que inician sus procesos reproductivos y a la duración de los mismos.

El crecimiento testicular en *C. mexicanus* reinicia en mayo, el máximo desarrollo se presenta en agosto y para octubre-noviembre los testículos presentan su tamaño mas bajo,

manteniéndose en condición de receso durante el resto del otoño, el invierno y el principio de la primavera (13). A pesar de los enormes cambios en el tamaño de los testículos durante el ciclo anual en éste quiróptero, no se tiene información detallada sobre sus cambios histológicos que son indispensables para caracterizar de manera precisa el patrón reproductivo masculino de la especie.

III- Cambios macro- y microestructurales del testículo en otros mamíferos con reproducción estacional.

Algunos mamíferos no quirópteros que se reproducen estacionalmente presentan ciclos circanuales de crecimiento e involución testiculares, que involucran variaciones morfológicas y en el número de determinados tipos celulares en ambos compartimientos del testículo, el tubular y el intersticial (18, 19). Entre las especies estudiadas se incluye al hyrax de las rocas (20), el caballo (21), el hámster (22) y cérvidos de origen septentrional (23). Para el caso de los murciélagos de zonas frías, si bien es notoria la presencia de cambios macroscópicos considerables del testículo a través del ciclo anual, los estudios han sido enfocados principalmente hacia la descripción meramente cualitativa de éstos cambios y existen pocos datos de tipo cuantitativo que permitan comparar con otras especies de mamíferos.

Los principales cambios observados en el compartimiento intersticial entre la condición activa e inactiva del testículo, que han sido reportados para diferentes especies de mamíferos estacionales, incluyen modificaciones en el volumen del tejido completo, de los vasos

sanguíneos, de las células de Leydig y de los macrófagos (16, 22); así como desdiferenciación-rediferenciación (24) y cambios en el número de las células de Leydig (25, 26, 27). En el compartimiento tubular se han registrado cambios en el volumen, diámetro y longitud de los túbulos seminíferos (28), y en el tamaño del lumen tubular (22).

Las células de Sertoli han recibido especial atención por la íntima relación que tienen con el proceso de espermatogénesis. Las principales variaciones estacionales en estas células somáticas son de tipo morfológica y funcional (29, 30, 31), pues se considera que el número de células de Sertoli es estable e inmodificable por hormonas después de la pubertad (32, 33), son notables por su resistencia a estímulos que inducen la muerte en otros tipos celulares (34, 35), y son consideradas terminalmente diferenciadas en su forma adulta (30). Sin embargo, algunos estudios en especies de reproducción estacional, como el caballo (27, 36), el hámster (22, 37), la viscacha (31), el ciervo rojo (28) y el carnero (38, 39), reportan la existencia de variaciones temporales en el número de células de Sertoli, lo que resalta la importancia de los estudios en especies de murciélagos estacionales que presentan un solo ciclo reproductivo, para evaluar la posibilidad en la existencia de cambios numéricos en la población de células de Sertoli en el individuo adulto.

Las modificaciones cualitativas y cuantitativas más conspicuas se presentan en las células de la estirpe germinal, asociadas al proceso de la espermatogénesis, el cual implica una compleja serie de eventos en los que las espermatogonias proceden a través de rondas sucesivas de mitosis, meiosis y diferenciación celular, para convertirse en espermatozoides (37, 40, 41).

Como fue mencionado en párrafos anteriores, hay una relación estrecha de las células de Sertoli con las células germinales a las que dan sustento y protección para una adecuada ejecución de la espermatogénesis. Las células de Sertoli tienen capacidad para dar soporte a un número limitado de células germinales. Se ha estimado que una sola espermatogonia podría generar 256 espermatozoides (42); sin embargo, entre un 25% y un 75% se pierden por causas naturales durante la espermatogénesis (43, 44). Actualmente se considera que la apoptosis es el mecanismo de eliminación principal que balancea la sobreproducción de células germinales (45, 46, 47, 48, 49, 50, 51).

IV- La apoptosis en células del testículo.

IV.1. Generalidades de la apoptosis.

Se ha considerado que todas las células nucleadas contienen un programa suicida interno (muerte celular programada) que, sobre la estimulación por señales apropiadas, pone en funcionamiento la apoptosis, nombre asignado al suicidio y eliminación ordenada de células en la ausencia de reacción inflamatoria (52).

La apoptosis generalmente afecta células individuales, causando su desprendimiento de las células vecinas y de la matriz extracelular (52). Su mecanismo central, conservado evolutivamente desde los gusanos hasta los mamíferos, consiste de tres componentes principales: las proteínas de la familia Bcl2, las caspasas pertenecientes a una familia de

cisteína proteasas, que cortan después de residuos de ácido aspártico y, las proteínas Apaf-1/CED-4 que transmiten las señales integradas por las proteínas de la familia Bcl-2 a las caspasas (53). La activación bioquímica de esos tres componentes es responsable de los cambios morfológicos de las células observados en la apoptosis (54).

Distintivamente, durante la parte inicial del proceso de apoptosis, la activación de endonucleasas dependientes de calcio-magnesio, resulta en la digestión del DNA de unión, desprendiéndose fragmentos nucleosomales en múltiplos de entre 185-200 bases; las células se encogen debido a la reducción en la cantidad del citoplasma y por la condensación de la cromatina; también hay ruptura nuclear (52, 55). La fragmentación internucleosomal del DNA que ocurre previo a la aparición de los cambios morfológicos de la apoptosis, puede ser detectada por electroforesis cuando se presenta un corrimiento del DNA característico en escalera (55) o como una tinción nuclear por el marcaje de la porción terminal de los fragmentos del DNA, utilizando nucleótidos acoplados a otros compuestos y transferidos enzimáticamente, método conocido como TUNEL por sus siglas en inglés: TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (56).

En la membrana plasmática ocurren cambios como la pérdida de la simetría y del acoplamiento membranal, así como la formación de estructuras en forma burbuja “blebs” (52). En una etapa siguiente, el citoplasma se fragmenta formándose los llamados cuerpos apoptóticos, estructuras vesiculares membranosas que contienen porciones nucleares, esos

cuerpos son eliminados rápidamente por células fagocíticas o por células vecinas, evitando así una reacción inflamatoria y daño al tejido (57).

IV.2. Implicaciones de la ejecución normal y la estimulación anormal de la apoptosis en el desarrollo y función del testículo.

La apoptosis es de gran importancia para el desarrollo del testículo; tres factores mayores parecen controlar el inicio de éste tipo de muerte celular: (i) la edad del individuo, (ii) la concentración sérica de la hormona folículo estimulante (FSH), probablemente de la hormona luteinizante (LH), la concentración de hormonas esteroideas como la testosterona, y (iii) la etapa del epitelio seminífero (45, 52, 58).

Estudios en la rata, han permitido distinguir que un importante número de las células de Leydig experimentan apoptosis durante el periodo perinatal, la cantidad de eliminación disminuye hasta ser escasa después del día 7 postnatal (59), y en la pubertad (16-24 días de edad), ni las células de Leydig ni las células de Sertoli presentan evidencias de fragmentación del DNA (58). En las células germinales un oleaje masivo pero fisiológico de apoptosis entre las espermatogonias ocurre con la primera ronda de espermatogénesis; mientras que la eliminación de espermatogonias es esporádica en el individuo adulto (60, 61).

También en la rata adulta, se ha observado que la mayor proporción de células germinales que experimentan apoptosis son las espermatogonias $A_{2,4}$, y la proporción va disminuyendo en los

espermatoцитos primarios, los secundarios y en las espermátidas, respectivamente (48, 49, 50, 58, 62). Las espermatogonias A_{1-2} , así como las intermedias raramente degeneran (43).

Pero un exceso de apoptosis puede causar infertilidad debido a la pérdida masiva de células germinales (63), lo que resalta la importancia de entender mejor la participación de la apoptosis y por ende su modulación en el desarrollo del testículo. La estimulación de la apoptosis en células germinales tiene una regulación controlada; sin embargo, se ha visto que la estimulación puede ser aumentada debido a ciertos tipos de estrés, como en la hipertermia (64) y el estrés oxidativo (63, 65). La eliminación celular por apoptosis se ve potenciada además al retirar el soporte hormonal (66, 67, 68), y en la criptorquidia (69, 70, 71, 72).

IV.3. Apoptosis en el testículo de mamíferos con reproducción estacional.

En los mamíferos que se reproducen estacionalmente, la reducción en la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), es seguido por la disminución en la concentración de FSH, de LH, de prolactina (PRL) y de las hormonas esteroides testiculares; eventos endocrinos que subsecuentemente provocan el cese en la espermatogénesis y los individuos entran en inactividad reproductiva (73). Para muchas especies, la medición y el monitoreo de los cambios diarios en el fotoperiodo son traducidos en señales fisiológicas a través de la secreción nocturna de la melatonina pineal (19). En ciertos roedores, el fotoperiodo corto o una larga duración de la secreción nocturna de melatonina disminuyen la función reproductiva (74). En los murciélagos, es posible que el fotoperiodo también tenga un

papel importante como señal próxima de la reproducción (75); aunque solamente se cuenta con evidencias experimentales claras del efecto del fotoperiodo en los machos de la especie *Antrozous pallidus* (76).

En el hámster húngaro *Phodopus sungurus* y en el ratón de patas blancas *Peromyscus leucopus*, especies fotosensibles reconocidas, un aumento en el índice de apoptosis está relacionado con la regresión testicular que resulta de la exposición a un régimen de fotoperiodo corto (77, 78, 79). De manera diferente, la recrudescencia testicular, que es precedida por la liberación de FSH, LH y concomitantemente una elevación de PRL y testosterona séricas (80, 81), es independiente del fotoperiodo; se ha visto que esos cambios endocrinos inducen la regeneración celular activa en el testículo, incluyendo la proliferación de las espermatogonias y la angiogénesis (81, 82). En el ratón de patas blancas fotoinhibido, la disminución en la apoptosis testicular precede a la recrudescencia espontánea del testículo, después de 26 semanas de exposición al fotoperiodo corto (83).

Un estudio de histología ordinaria y electrónica, efectuado en especímenes del vespertiliónido *Miniopterus inflatus* únicamente durante la parte inicial del invierno, cuando los individuos están en condición de letargo sexual en una zona fría de Kenia, mostró algunas evidencias cualitativas, que indican de la ocurrencia de apoptosis en ambos compartimientos del testículo (tubular e intersticial), por lo que se considera que la apoptosis tiene participación en la regresión testicular de esta especie de murciélago (84). Sin embargo, no existen trabajos

realizados en ninguna otra especie de murciélago, donde se evalúe la degeneración y muerte celular a lo largo del ciclo testicular completo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Durante el ciclo reproductivo de los mamíferos, los individuos del sexo masculino presentan importantes cambios de tipo morfológico e histológico en los testículos, así como un intenso recambio celular asociado al proceso de la espermatogénesis. La realización de estudios enfocados al conocimiento de esos cambios en el testículo, es importante ya que permitirán entender mejor la función sexual masculina principal, que a su vez, determina parte de la fertilidad requerida para la perpetuación de la especie.

La investigación realizada en mamíferos de reproducción continua, como la rata, bajo condiciones controladas en el laboratorio, indican que durante la espermatogénesis hay una esporádica eliminación de células germinales debido a muerte celular por apoptosis, como un mecanismo para modular el número de células germinales que permanecen en el testículo y mantener la arquitectura de éste órgano reproductor. En los mamíferos estacionales, como el caso del hámster, donde las hembras son poliéstricas, la apoptosis tiene un papel más importante en la involución testicular, permitiendo que los testículos regresen a la condición de receso sin alteración en el epitelio seminífero. Mientras que en las especies monoéstricas, entre las que destacan diversas especies de quirópteros de zonas frías por ser altamente estacionales, los machos presentan cambios significativos en el tamaño de los testículos, lo

que los convierte en modelos adecuados para evaluar la participación que tiene la apoptosis en las diferentes fases del desarrollo testicular entre las condiciones activa e inactiva de la reproducción, identificar con claridad, que componentes microestructurales del testículo son los que determinan los cambios macroscópicos que ocurren a través del ciclo reproductivo, y contar con elementos para determinar si entre las células somáticas más importantes (células de Leydig y células de Sertoli) hay eliminación por apoptosis. Sin embargo, a la fecha no se cuenta con un estudio completo en murciélagos para responder a éstos cuestionamientos, siendo una de las razones de la carencia de información relacionada, la dificultad de trabajar con especies silvestres bajo las condiciones del ambiente natural, ya que es necesario contar con una muestra de especímenes con estatus de edad y condición reproductiva conocidos.

El murciélago *Corynorhinus mexicanus*, especie objeto del presente estudio, lleva a cabo un solo ciclo reproductivo por año, en los machos, la actividad testicular es acompañada por cambios drásticos de tamaño de los testículos y es desfasada temporalmente con respecto a los correspondientes cambios de los órganos sexuales secundarios. El contar con una población conocida para ésta especie de murciélago, cuyos individuos permanecen ocupando el mismo refugio a lo largo del año, permitió utilizar cohortes de individuos adultos con diferente condición reproductiva, para responder a los planteamientos señalados sobre la participación de la apoptosis durante el desarrollo testicular.

OBJETIVOS

- 1.** Precisar el patrón reproductivo masculino del murciélago *Corynorhinus mexicanus* con base en el registro de datos morfométricos de los diferentes órganos sexuales a lo largo de un ciclo anual.
- 2.** Describir los cambios histológicos del testículo durante el ciclo reproductivo, incluyendo la espermatogénesis.
- 3.** Detectar y cuantificar las células que presentan apoptosis en los compartimientos intersticial y tubular del testículo durante el ciclo reproductivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

I- Trabajo de campo (*Captura y selección de los animales de estudio*).

Para la obtención de los murciélagos *Corynorhinus mexicanus* se realizó un muestreo mensual y de manera quincenal o semanal cuando fue necesario, entre marzo de 1998 y enero de 2001, en un túnel localizado a 10 Km E de Tlaxco, Tlaxcala (19°37'14''N, 98°02'02''W; 3220 msnm). De 2 a 3 murciélagos machos, adultos fueron capturados con redes de niebla y/o de golpe, antes o al momento de salir de su refugio. A cada ejemplar se le registró el peso corporal con una balanza electrónica portátil Ohaus (± 0.1 g), la longitud del antebrazo con un vernier (± 0.1 mm) y fueron transportados al laboratorio en las instalaciones de la universidad

en la Ciudad de México, donde permanecieron por un tiempo no mayor a 24 horas. Los individuos fueron considerados adultos cuando presentaron completa osificación de las placas de crecimiento cartilaginoso epifisial en la unión metacarpo-falangeal del 3er dedo (85). Adicionalmente, algunos murciélagos juveniles fueron extraídos para realizar comparaciones exclusivamente respecto a la apariencia, la posición y las medidas externas de los órganos reproductores, pero estos individuos no fueron incluidos en los estudios histológicos e histoquímicos.

II- Trabajo de laboratorio.

II.1. Obtención de los tractos reproductores y preparación de los órganos sexuales.

Inmediatamente después de realizada la eutanasia, se registró la posición y apariencia de los órganos sexuales, el tracto reproductor completo fue extraído y cada órgano fue disecado y limpiado de tejidos conectivo y adiposo extras. Los diámetros mayor y menor de cada testículo fue medido; así como la longitud de los epidídimos; la distancia abarcando ambas glándulas ampulares en plano transversal y el diámetro mayor de la próstata, con un vernier (± 0.1 mm). El peso húmedo de cada órgano y del par de glándulas ampulares fueron obtenidos con una balanza de torsión electrónica Mettler (± 0.1 mg). Los epidídimos y las glándulas sexuales accesorias fueron fijados con formalina al 4% (V/V) en solución salina de fosfatos (PBS) pH 7.4 y preservados en etanol al 70% para otros estudios posteriores. Cada testículo fue

almacenado en un tubo de polipropileno y conservado en nitrógeno líquido donde permanecieron para su procesamiento histológico e histoquímico.

II.2. Estimación de la condición corporal de los murciélagos.

Con la finalidad de contar con elementos que permitieran evaluar el estatus de los murciélagos como una aproximación para conocer su condición física y de salud, en relación a la ejecución de los principales procesos reproductivos, se analizó la variación en la condición corporal de los individuos durante el ciclo anual. Para estimar la condición corporal se calculó la diferencia residual entre el valor de la masa corporal de cada individuo y el valor de la masa esperada, obtenido de la relación total entre el peso corporal y la longitud del antebrazo calculado para todos los murciélagos adultos (9): donde masa esperada= 0.162 (longitud del antebrazo) + 0.96 ($F= 15.77$, $r^2= 0.117$, $n= 123$, $P< 0.001$). Una vez obtenidos los resultados y después de observar la existencia de importantes variaciones en el peso de los diferentes órganos reproductores durante el ciclo anual, se decidió estimar la condición corporal no reproductiva. Esta fue calculada de la misma manera en que se calculó la condición corporal general, pero después de que el peso del tracto genital fue restado del peso corporal completo para cada individuo; en este caso, la masa esperada menos el peso del tracto genital= 0.143 (longitud del antebrazo) + 1.44 ($F= 15.18$, $r^2= 0.119$, $n= 123$, $P< 0.001$).

II.3. *Procesamiento histológico de los testículos.*

25 ejemplares del total de murciélagos empleados en éste estudio, fueron seleccionados considerando sus datos somáticos y reproductivos para analizar los cambios histológicos en los testículos, representando un ciclo anual. El testículo izquierdo de cada murciélago fue descongelado introduciéndolo en solución fijadora de formalina al 4%, a temperatura ambiente, donde permanecieron por 24 h y posteriormente, fueron procesados mediante un protocolo estándar consistente en: deshidratación con alcoholes de concentración gradual, aclaramiento con xilol e inclusión en paraplast plus (86). Los órganos incluidos fueron cortados en un micrótomo de rotación, obteniendo 4 secciones de tejido con grosor de 6 μm cada uno, de la porción media (plano sagital) del testículo. Cada sección histológica fue montada a un portaobjetos diferente, previamente recubiertos con poli L-lisina 0.01% (V/V).

Dos de las 4 secciones de tejido testicular fueron empleadas para realizar la descripción histológica general y para ello, los tejidos fueron teñidos con hematoxilina-eosina “H-E” (86), cubiertos con Entellan y observados en el campo claro de un microscopio Leica DMLS. De cada sección de tejido se midió el área total y se tomaron fotografías en 6 campos diferentes. Para la distribución de las fotografías se procedió de la siguiente manera: en la cara externa del portaobjetos se dibujó una línea a lo largo del eje correspondiente al diámetro mayor del corte histológico, dividiéndolo en mitades. Se dibujaron otras 2 líneas paralelas entre sí y perpendiculares a la primera, de esta manera, el corte histológico quedo dividido en 6 regiones diferentes pero con áreas proporcionalmente semejantes. En cada región de la sección de tejido se tomó una fotografía y de ésta imagen, se midió el área, se contó el número de células

intersticiales (excluyendo vasos sanguíneos) y se seleccionó 1 túbulo seminífero de apariencia redonda (plano transversal), haciendo un total de 6 túbulos por sección histológica testicular.

El número de células intersticiales se reporta por sección histológica completa del testículo y para obtenerlo, primero se calculó el número promedio de células contadas en las 6 diferentes fotografías, y considerando que todas las imágenes tuvieron el mismo tamaño de área, éste valor fue recalculado con respecto al área total de la sección histológica del testículo.

Los 6 túbulos seminíferos seleccionados fueron revisados para observar la presencia de los diferentes tipos celulares de la estirpe germinal, se les midió el diámetro (como el promedio de los diámetros mayor y menor en ángulos rectos), el área de la luz y se contó el número de células que conforman el epitelio seminífero (incluyendo células de sertoli y células germinales). Los datos correspondientes a cada una de las variables analizadas en éstos 6 túbulos indicados, son reportados como valores promedio por túbulo seminífero redondo.

Todas las fotografías analizadas fueron tomadas bajo el mismo objetivo (40X) y utilizando el programa para adquisición de imágenes DC-Viewer de Leica. Las mediciones fueron realizadas utilizando el programa para análisis de imagen IM-1000 de Leica.

II.4. *Procesamiento histoquímico de los tejidos testiculares para la detección de apoptosis.*

Para la detección de apoptosis se emplearon las 2 preparaciones de tejidos testiculares restantes, de las 4 que fueron obtenidas por cada testículo, que fueron procesadas como se indicó en el capítulo II.3. Las secciones de tejido fueron desparafinados con xilol, rehidratados con soluciones de concentración descendente de etanol, tratados con 50 μ l de una solución de proteinasa K (20 μ g/ml) durante 20' a temperatura de laboratorio y procesados por el método de TUNEL (56, 87). El fundamento de éste método consiste en propiciar la polimerización de los fragmentos del DNA generados por apoptosis, utilizando nucleótidos acoplados a un compuesto que imprimirá una marca detectable, la cual será revelada con una herramienta de la microscopía. En particular se utilizaron nucleótidos uridina acoplados al fluorocromo isotiocinato de fluoresceína (FITC) para ser transferidos y unidos a la porción terminal 3'-OH de los fragmentos de DNA en las células en apoptosis, por medio de la transferasa TdT (Terminal deoxynucleotidil Transferase).

Los tejidos sometidos al método de TUNEL fueron incubados por 60' a 37°C en cámara húmeda, con 50 μ l de una mezcla de reacción conteniendo TdT y uridina-FITC. Al término de la reacción, los tejidos fueron lavados con PBS y recubiertos con Vectashield. Cada ensayo de reacción TUNEL incluyó un control positivo, el cual consistió de una sección de tejido testicular tratada con 50 μ l de solución DNasa I (50 μ g/ml) durante 10' a 37°C para provocar la fragmentación del DNA (56); como control negativo, otra sección de tejido diferente, fue procesada por el método de TUNEL, pero excluyendo la TdT de la mezcla de reacción. Las preparaciones de tejido procesadas por TUNEL fueron observadas y fotografiadas en un

microscopio confocal láser de barrido Zeiss 510, utilizando la herramienta de epifluorescencia, con la longitud de onda de excitación de 488 nm para revelar las marcas fluorescentes de la FITC (cada marca fue considerada como una célula TUNEL(+), indicativa de apoptosis). Además se obtuvo una fotografía del mismo campo de observación por epifluorescencia, utilizando el contraste de Normanski para determinar la ubicación de las marcas fluorescentes en los diferentes compartimientos del testículo.

La cuantificación de las células en apoptosis fue realizada de acuerdo al siguiente procedimiento: cada sección de tejido testicular analizada fue dividido en 6 regiones, de la misma manera como se explicó en el capítulo II.3 para los tejidos teñidos con H-E. De cada región se tomó una fotografía directamente del microscopio confocal. El área de la imagen fue obtenida utilizando el programa IM-1000 de Leica. Para estimar el índice de apoptosis en el compartimiento intersticial, primeramente se contaron las marcas fluorescentes por fotografía, se calculó el número promedio de células intersticiales TUNEL(+) para las 6 fotografías y después se calculó el porcentaje de células TUNEL(+) con respecto al número total de células intersticiales por sección histológica completa del testículo, que ya era conocido, y finalmente, el valor se calculó por mm^2 de tejido testicular. Para obtener el índice de apoptosis del compartimiento tubular, se contaron las células marcas fluorescentes en el epitelio de un túbulo seminífero redondo por cada una de las 6 imágenes de tejido testicular y posteriormente, se calculó el porcentaje de células TUNEL(+) del epitelio con respecto al número total de células por túbulo seminífero redondo, que ya era conocido.

II.5. Reactivos y soluciones empleadas.

Método histológico--Como fijador se empleó formol comercial (J. T. Baker, México). La solución PBS fue preparada con: NaCl (0.1 M), KH_2PO_4 (0.01 M) y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.055 M); las sales empleadas fueron J. T. Baker. El medio de inclusión de tejidos Paraplast Plus fue de TYCO Healthcare Group LP, MA, EUA. La solución para adhesión de tejidos Poli L-lisina 0.01% (V/V) fue preparada a partir de una solución 0.1% (W/V) de Sigma-Aldrich Co., St. Louis MO, EUA. Los colorantes hematoxilina de Harris y eosina amarillenta fueron obtenidos de Sigma-Aldrich de México. La resina de montaje Entellan fue obtenida de MERCK KgaA Alemania.

Método histoquímico--La proteinasa K fue disuelta en PBS; mientras que la DNasa I (tipo II de páncreas bovino) fue preparada en una solución de Trisma (10 mM), KCl (50 mM) y MgCl_2 (10 mM), pH 7.5 (56). Ambas enzimas fueron de Sigma-Aldrich Co., St. Louis MO, EUA. Los componentes del medio para preparación de la DNasa I fueron obtenidos del kit comercial para PCR: buffer II (10X) y MgCl_2 (25 mM), de los laboratorios Perkin Elmer (Roche Molecular Biochemical, Alemania). La mezcla de reacción TUNEL fue elaborada a partir de una solución amortiguada conteniendo la enzima TdT (de timo de ternera), y una solución amortiguada conteniendo nucleótidos uridina acoplados a FITC. Ambos componentes fueron obtenidos y preparados siguiendo las instrucciones del kit comercial para identificación de apoptosis "In Situ Cell Death Detection Kit, AP" de Laboratorios Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis In, EUA. La solución de montaje Vectashield fue obtenida de Vector Laboratories, Inc., CA, EUA.

III- Análisis estadístico.

En cada una de las variables de estudio, los datos obtenidos fueron agrupados mensualmente y comparados para analizar los cambios a lo largo de un ciclo anual, utilizando el programa estadístico Stata® 7.0 (88). La homogeneidad de las varianzas entre los grupos de datos fue comprobada mediante la prueba de Bartlett y la prueba de Levene (89).

Las variables correspondientes a las medidas somáticas (peso corporal, longitud del antebrazo, condición corporal y condición corporal no reproductiva) y las variables respectivas para la morfología gruesa de los diferentes órganos sexuales (peso y tamaño), fueron analizadas mediante ANDEVA seguido de la prueba de Bonferroni (89). Los datos correspondientes a características microestructurales del testículo, como son: el diámetro de los túbulos seminíferos, el área del lumen tubular, el número de células del epitelio seminífero y el número de células intersticiales, fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (*U* de Mann-Whitney) para dos muestras (89). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$. De los datos correspondientes al tipo de células germinales y el índice de apoptosis para ambos compartimientos del testículo, solamente se reporta la variación mensual de los valores promedio y no se realizó un análisis estadístico comparativo debido al bajo número de muestras registrado.

RESULTADOS.

I- Estatus de edad, condición corporal y reproductiva de los murciélagos *Corynorhinus mexicanus*.

Un total de 123 murciélagos machos adultos y 4 juveniles *Corynorhinus mexicanus* fueron incluidos en el presente estudio. Los adultos tuvieron en promedio, una longitud del antebrazo de 41.6 mm (± 0.9 mm) y un peso corporal de 7.7 g (± 0.5 g). La variación mensual en los valores de la longitud del antebrazo no presentó diferencias estadísticamente significativas a lo largo del ciclo anual (ANDEVA, $F= 1.49$, $P= 0.147$); mientras que la variación mensual del peso corporal si mostró cambios considerados significativos (cuadro 1). Los murciélagos capturados en el periodo de primavera-verano tuvieron valores de peso corporal altos, siendo particularmente en el mes de agosto, cuando los animales presentaron el mayor peso, así como una mayor condición corporal, índice que resulta de la relación entre el peso corporal y la longitud del antebrazo, por lo que esos murciélagos fueron considerados con una “condición corporal buena” (cuadro 1). Comparativamente, los individuos obtenidos en otoño-invierno presentaron peso corporal bajo, lo cual se vió reflejado en una “condición corporal pobre” (cuadro 1).

En los meses de enero-abril se capturaron murciélagos juveniles que presentaron medidas somáticas comprendidas dentro del intervalo correspondiente para los adultos. Dos ejemplares de enero y febrero fueron considerados sexualmente inmaduros, ya que el tamaño de los testículos y epidídimos era muy pequeño para ser perceptibles externamente (figura 1b).

Mes de captura	<i>n</i>	Peso corporal total (g)	Condición corporal relativa (residuales)	
			A	B
Enero	4	7.3 ± 0.2 ^{ab}	-0.411 ^a	-0.262 ^a
Febrero	7	7.1 ± 0.3 ^a	-0.472 ^a	-0.261 ^a
Marzo	11	7.5 ± 0.3 ^{ab}	-0.196 ^b	0.027 ^{ab}
Abril	9	7.4 ± 0.4 ^{ab}	-0.272 ^b	-0.034 ^{ab}
Mayo	12	7.9 ± 0.4 ^{bc}	0.153 ^c	0.345 ^c
Junio	16	7.9 ± 0.3 ^{bc}	0.219 ^c	0.335 ^c
Julio	16	7.7 ± 0.2 ^{bc}	0.111 ^c	0.108 ^b
Agosto	19	8.1 ± 0.4 ^c	0.401 ^d	-0.118 ^a
Septiembre	11	7.7 ± 0.2 ^{bc}	0.020 ^{bc}	-0.214 ^a
Octubre	8	7.3 ± 0.2 ^{ab}	-0.287 ^b	-0.242 ^a
Noviembre	5	7.1 ± 0.1 ^a	-0.510 ^a	-0.407 ^d
Diciembre	5	7.4 ± 0.1 ^{ab}	-0.332 ^a	-0.225 ^a

Cuadro 1. Variación mensual del peso corporal y la condición corporal relativa de los murciélagos *C. mexicanus*. El peso corporal es expresado como el valor de la media por mes del número de individuos indicado como $n \pm DE$. La condición corporal relativa es expresada como la media de los residuales (ver el texto). En (A), la condición corporal relativa fue calculada considerando el peso corporal total. En (B), el peso del tracto reproductor fue sustraído del peso corporal total. Letras distintas = Diferencias significativas con respecto al valor del mes previo (ANDEVA a $P < 0.05$). Los valores obtenidos para el peso corporal total fueron ($F = 8.49$, $P < 0.01$); para la condición corporal relativa (A: $F = 8.44$, $P < 0.01$, y B: $F = 6.63$, $P < 0.01$). Los datos correspondientes a la longitud del antebrazo no se muestran debido a que no se observaron diferencias significativas cuando los valores de la media mensual fueron comparados (ANDEVA, $F = 1.49$, $P = 0.147$).

Al realizar la exploración interna de uno de esos murciélagos, se notó que los órganos sexuales presentaron una tonalidad blanquecino-translúcida; los testículos se encontraban en el canal inguinal, cercanos al interior de la cavidad abdominal y tuvieron en promedio, 3.8 x 2.2 mm y 6.8 mg de peso húmedo por órgano. Los datos promedio de los epidídimos fueron 9.8 mm de longitud y 5.3mg de peso húmedo por órgano. Otros 2 animales capturados entre marzo y abril fueron considerados como prepuberes, debido a que para entonces, los testículos se localizaron en posición inguinal y presentaron una coloración blanquecino-amarillenta, la región caudal de los epidídimos mostró una forma ligeramente deprimida dorso-ventralmente y una pequeña elongación, lo suficiente para ser perceptibles externamente. El tamaño y peso de los órganos sexuales fueron un poco mayores en los murciélagos jóvenes de marzo-abril con respecto a los de enero-febrero.

En los murciélagos adultos, los testículos fueron observados invariablemente en posición inguinal (figura 1d), una zona recubierta por un denso pelaje; la región caudal de los epidídimos mostró una apariencia elongada y bulbosa, claramente visibles en la desnuda membrana interfemorale (figura 1c, h, i).

En el periodo de noviembre a abril los testículos fueron inconspicuos externamente debido a su pequeño tamaño (figuras 1c, 2); mientras que la situación opuesta se observó en los epidídimos y las glándulas sexuales accesorias, que de noviembre-enero presentaron los valores mas altos de su tamaño y peso húmedo (figuras 1i, 2). En mayo reinició el crecimiento de los testículos; en julio ya fue posible distinguirlos con claridad a simple vista (figura 1d) y

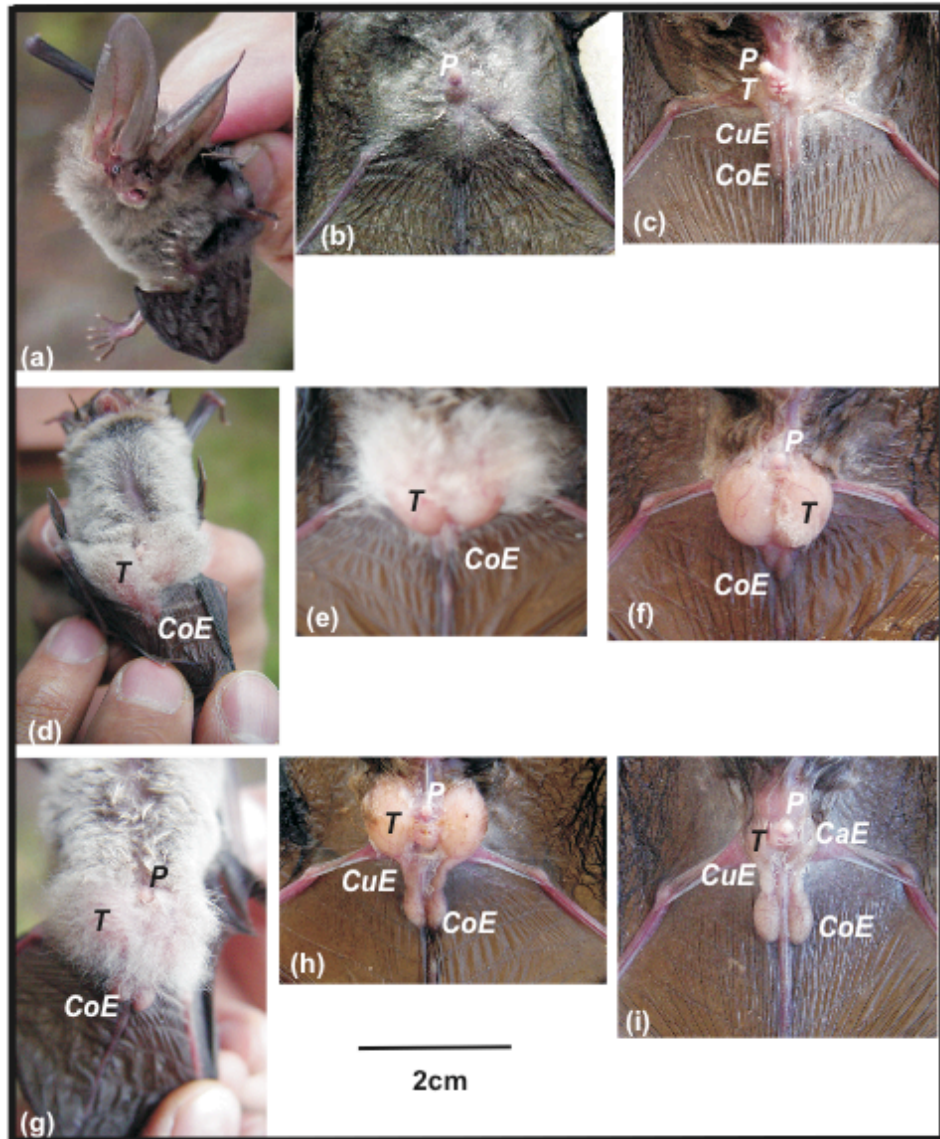


Figura 1. Fotografías de murciélagos *Corynorhinus mexicanus*. (a) Ejemplar representativo de la especie, (b-i) vistas ventral-posterior donde se muestran los principales cambios en la apariencia externa de los órganos sexuales masculinos comparativamente entre (b) un individuo juvenil y (c-i) diferentes ejemplares adultos. Mes de captura de los murciélagos: (b, c) febrero, (d) julio, (e, f) agosto, (g, h) septiembre, (i) octubre. En c, f, h, i, el pelaje fue humedecido y separado para apreciar mejor los genitales. Regiones del epidídimo: CaE= cabeza, CuE= cuerpo, CoE= cola; P= pene, T= testículo.

en agosto alcanzaron el tamaño máximo, lo que provocó la distensión de la piel y la separación del pelaje del escroto (figuras 1e, f, 2). Un desfase en el reinicio del crecimiento de los diferentes órganos sexuales fue evidente, ya que los epidídimos tuvieron un aumento significativo en sus medidas a partir de junio; mientras que, en las glándulas ampulares y la próstata, el aumento fue notorio a partir de julio (figura 2). La involución testicular ocurrió súbitamente entre septiembre y octubre, en noviembre presentaron los valores mínimos en su tamaño y peso (figuras 1g-i, 2). A partir de octubre, la región caudal del epidídimo presentó una apariencia indicativa de que se encontraba congestionada con espermatozoides (figura 1i). La involución de los epidídimos y de las glándulas sexuales accesorias ocurrió durante enero-febrero, para llegar a los valores más bajos en marzo y mantenerse así hasta el mes de junio (figura 2).

Dado a la existencia de cambios marcados en el peso de los diferentes órganos sexuales, y principalmente el de los testículos a lo largo del ciclo anual, al restar el peso del tracto reproductor del peso corporal de cada murciélago y calcular nuevamente el índice de condición corporal (=condición corporal no reproductiva), los resultados volvieron a indicar nuevamente, que durante los meses de noviembre-febrero, los murciélagos tuvieron una “condición corporal pobre”; mientras que a diferencia, los murciélagos capturados en mayo y junio fueron quienes presentaron una “condición corporal buena” (cuadro 1).

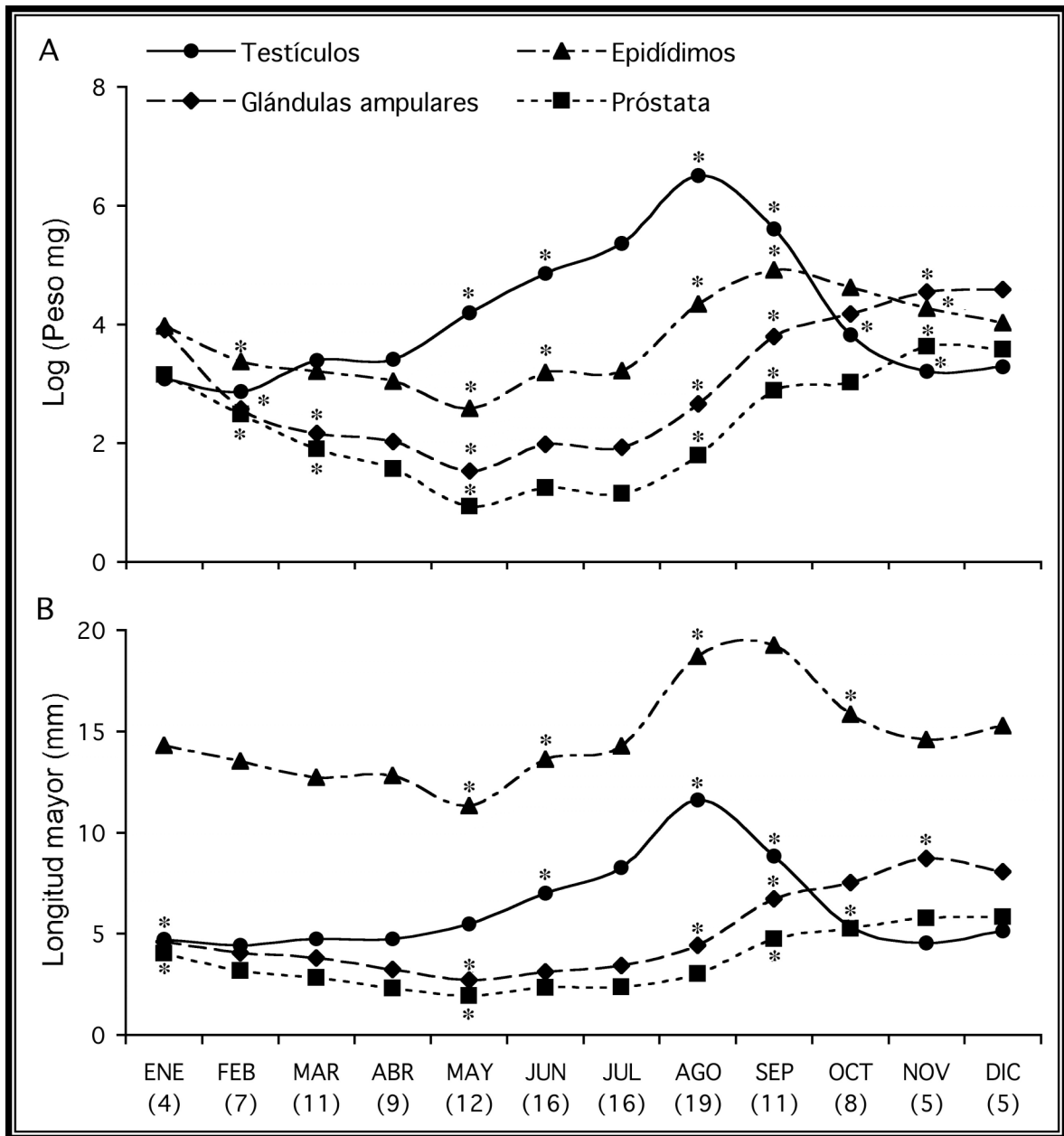


Figura 2. Variación mensual interanual en los órganos reproductores masculinos de individuos adultos *C. mexicanus*. (A) el peso es indicado como el log de los mg sumados del par de órganos de cada murciélago, excepto para la próstata que es simple. (B) longitud mayor en mm de un órgano por murciélago. Los puntos representan los valores de la media, los cuales fueron unidos por líneas suaves. Entre paréntesis se indica el número de murciélagos. * = Diferencias significativas con respecto al valor del mes previo (ANDEVA a $P < 0.05$).

II- El ciclo de cambios histológicos del testículo, incluyendo la espermatogénesis.

El diámetro de los túbulos seminíferos redondos y el número de células del epitelio seminífero, presentaron cambios mensuales durante el ciclo anual en paralelo con los cambios del tamaño y el peso húmedo de los testículos. En el periodo de noviembre-abril se registraron los valores mas bajos en las dos variables histológicas mencionadas (figuras 3A, B, 4B), el epitelio seminífero estuvo conformado por una sola capa de células y presentó un número promedio de 40.4 células/túbulo transversal durante este periodo del año. Las escasas espermatogonias fueron claramente diferenciadas por su forma voluminosa y núcleo ovoide, mientras que las células de Sertoli presentaron una forma columnar y el núcleo en posición superior con respecto al de las espermatogonias (figura 5-I). En mayo reinició el aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos y en el tamaño de su población celular (figuras 3A, B, 4B). En mayo-junio, el epitelio seminífero se conformaba al menos de 3 capas celulares y se presentó evidencias de actividad mitótica, debido a la presencia de algunas espermatogonias tipo B identificadas por su núcleo redondo, ubicadas en la capa basal del epitelio, y espermatocitos primarios reconocidos por su menor diámetro y con núcleo de tono mas oscuro, localizadas en las capas superiores del epitelio (figuras 5-II, 6A, B).

A partir de la primera quincena de julio, se apreciaron evidencias de actividad meiótica, debido a la presencia de espermatocitos primarios en paquíteno (figuras 5-III, 6B) en la capa apical del epitelio, por lo que se considera que se ha establecido compartimiento adluminal del epitelio seminífero. En la segunda mitad de julio, resaltó la presencia de células de diámetro pequeño y núcleo claro, correspondientes a espermátidas redondas adicionando algunas capas

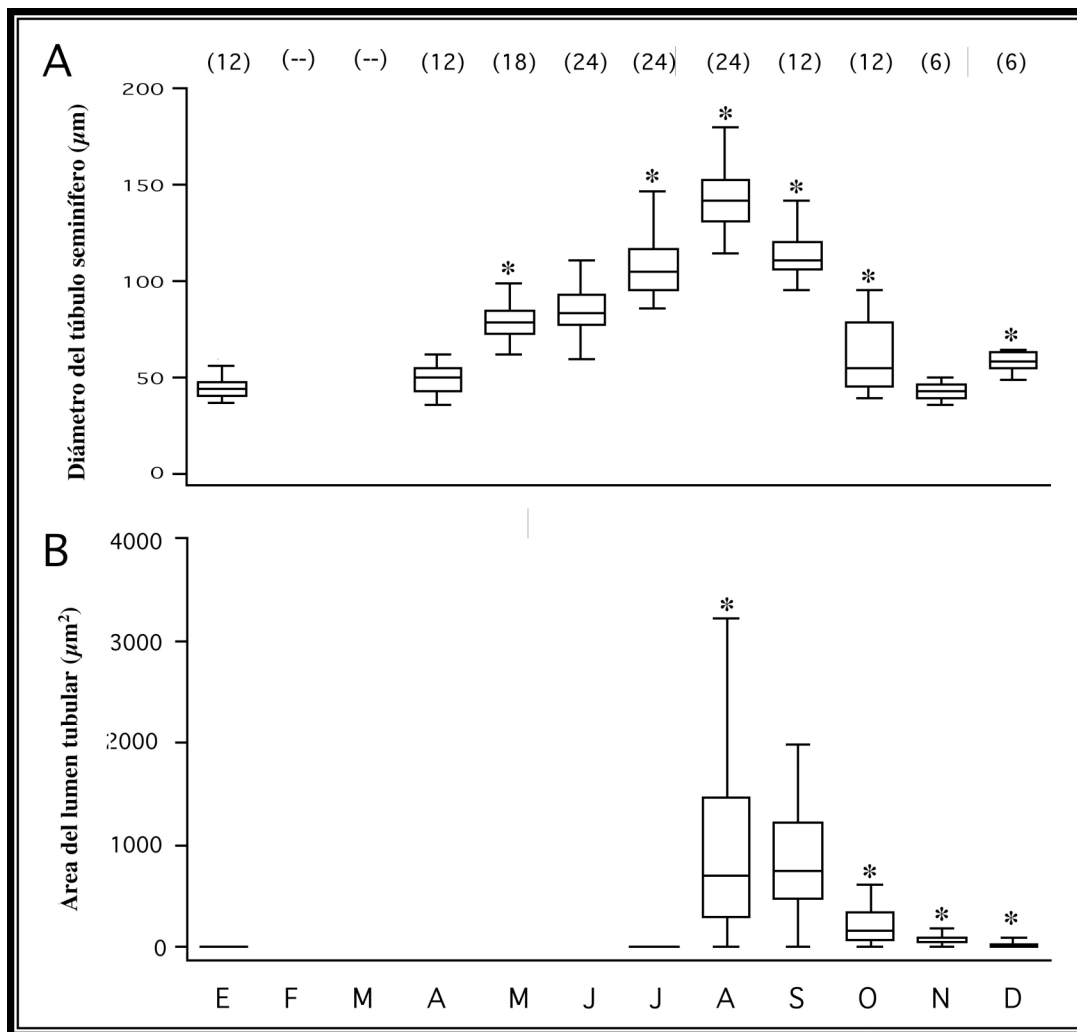


Figura 3. Variación mensual interanual en las características histológicas del testículo en *C. mexicanus*. (A) Diámetro del túbulo seminífero transversal, (B) área del lumen tubular. Se midieron 6 túbulos en una sección histológica, por testículo, por murciélago. Se presentan los valores mensuales de la mediana (\pm cuartiles) para el número de túbulos indicado entre paréntesis. * = Diferencias significativas con respecto al valor del mes previo (Kruskal-Wallis a $P < 0.05$).

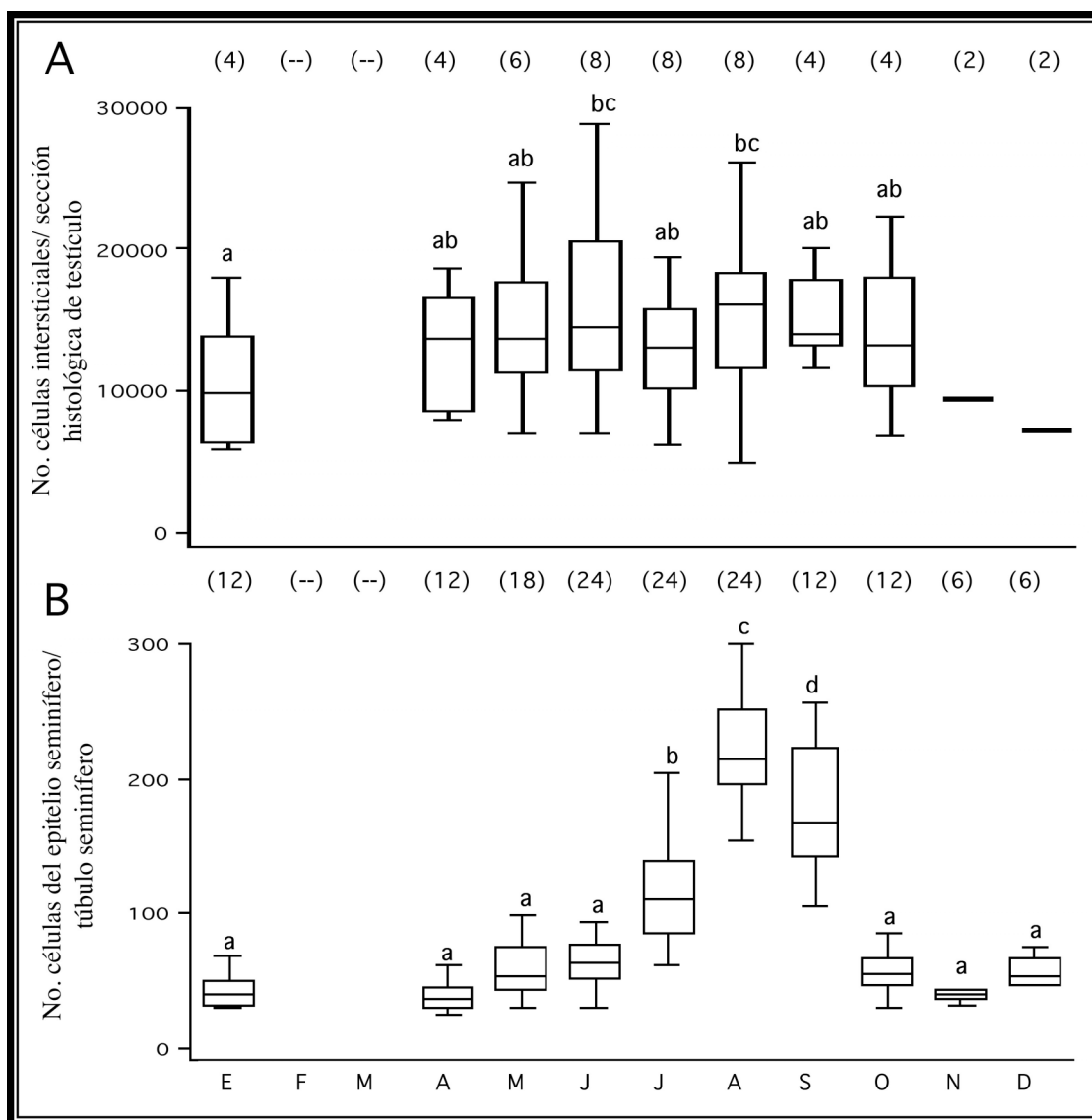


Figura 4. Variación mensual interanual en el número de células testiculares de los murciélagos *C. mexicanus*. (A) compartimiento intersticial; se contaron las células intersticiales (excluyendo vasos sanguíneos y tejido conectivo) en 2 secciones histológicas completas de un testículo por murciélago. Se presentan los valores de la mediana (\pm cuartiles) del número de células por sección histológica, para el número de secciones indicado entre paréntesis. Letras diferentes = diferencias significativas con respecto al valor del mes previo (Kruskal-Wallis a $P < 0.05$). Noviembre y diciembre no fueron incluidos en el análisis estadístico por contar con menos de 3 datos y solo se muestran los valores promedio.

(B) compartimiento tubular; se contaron las células que conforman el epitelio seminífero de 6 túbulos transversales de una sección histológica, por testículo, por murciélago. Se presentan los valores de la mediana (\pm cuartiles) del número de células por túbulo, para el número total de túbulos indicado entre paréntesis. Letras diferentes = diferencias significativas con respecto al valor del mes previo (Kruskal-Wallis a $P < 0.05$).

mas al compartimiento adluminal, y denotando el reinicio de la etapa de espermiogénesis (figuras 5-IV, 6C).

En agosto se registraron los valores máximos del año para el diámetro de los túbulos seminíferos, con un promedio de 142.9 μm (figura 3B) y en la población celular del epitelio, con un promedio de 230 células/túbulo (figura 4B); además, hubo un evidente incremento en el número de túbulos que presentaron espermatogonias B, espermatocitos y espermátidas redondas (figura 6A-C). Particularmente, en la primera mitad de agosto se apreciaron espermátidas en proceso de elongación ubicadas hacia la luz del túbulo (figuras 5-V), y fue en la segunda mitad del mes, que se observaron las primeras espermátidas elongadas y espermatozoides (figuras 5-VI, 6D, E). En algunos túbulos, las espermátidas elongadas y/o espermatozoides estuvieron organizados en largos paquetes orientados perpendicularmente a la base del túbulo (figura 5-VIa, b); mientras que en otros túbulos, estos tipos celulares conformaban una capa concéntrica hacia la luz (figura 5-VIc, d).

Durante los meses de septiembre y octubre, el diámetro tubular y el número de células del epitelio seminífero disminuyeron, y en noviembre, ambas variables llegaron a sus valores más bajos (figuras 3A, B, 4B). En septiembre, el epitelio seminífero se caracterizó por presentar mayor proporción de espermátidas elongadas y espermatozoides con respecto a los espermatocitos y espermátidas redondas (figuras 5-VII, 6B-E). Para la primera quincena de octubre, solo escasos túbulos seminíferos contenían espermátidas elongadas y espermatozoides (figura 5-VIIIa, b), y en algunos túbulos se apreció desfoliación de lo que

podieron ser espermatozoides o espermatocitos redondos que no avanzaron en su maduración (figura 5-VIIIc, d); datos indicativos del cese en la actividad espermatogénica.

El lumen de los túbulos seminíferos mostró una dinámica de apertura-cierre a lo largo del ciclo anual. Durante febrero-junio, el lumen permaneció completamente cerrado (figuras 3C, 5-I, II). La apertura ocurrió súbitamente ya que en julio, solo algunos túbulos presentaban una pequeña luz (figuras 3C, 5-III); mientras que en agosto, la mayoría presentaron el área luminal significativamente más grande (figuras 3C, 5-V). De forma opuesta, el cierre del lumen tubular ocurrió pausadamente de septiembre a enero (figuras 3C, 5-VII, VIII).

En relación al compartimiento intersticial, considerando todos los cortes histológicos del testículo de los murciélagos estudiados en su conjunto, se registró un valor promedio de 13033 células intersticiales/sección histológica. Si bien el número mensual de células intersticiales no presentó fluctuaciones marcadas a lo largo del ciclo anual, en los murciélagos capturados de junio a septiembre, las secciones de tejido tuvieron significativamente más células intersticiales al compararlos con los tejidos de animales capturados en los restantes meses del año, con excepción de julio, mes en que sorpresivamente se registrara una disminución en el número de células intersticiales/ sección histológica (figura 4A).

De noviembre a enero, periodo en que se presentaron los valores más bajos para el número de células intersticiales (figura 4A), estas se observaron rodeando casi por completo a los túbulos seminíferos, acumulándose mayormente en grandes espacios entre túbulos que están en

contacto (figura 5-I). En diciembre se registró el menor número de células intersticiales, con 7173 células/sección histológica en promedio (figura 4A). A partir de mayo las células intersticiales fueron confinadas a pequeños espacios entre túbulos adyacentes (figuras 5-II-IV). En agosto, cuando los túbulos alcanzaron su diámetro máximo, solo unas pocas células podían distinguirse en los reducidos espacios de tejido intersticial ínter tubular (figura 5-V, VI); sin embargo, fue en este mes cuando se registró el mayor número de células intersticiales del año, con un promedio de 16198 (figura 4A).

III- Índice de apoptosis en los tejidos testiculares durante el ciclo reproductivo.

Células marcadas como TUNEL(+), indicativas de apoptosis, fueron detectadas en los dos compartimientos del testículo (tubular e intersticial) de los murciélagos *C. mexicanus* capturados durante junio-septiembre, periodo correspondiente a la actividad espermatogénica (figuras 8-IV-VII). Mientras que en la fase final del periodo de involución testicular (octubre), toda la etapa inactiva de la espermatogénesis (noviembre-abril) y en el reinicio del crecimiento testicular (mayo), no se observaron células TUNEL(+) en ninguno de los compartimientos del testículo (figuras 7, 8-III, VIII).

En el mes de junio, se analizaron los tejidos testiculares de dos murciélagos, en uno de ellos solamente se detectaron pocas células TUNEL(+) en ambos compartimientos del testículo (figura 8-IVa, b); mientras que en los tejidos testiculares del otro individuo presentaron un número considerablemente mayor de células TUNEL(+) (figura 8-IVc, d). Al promediar los

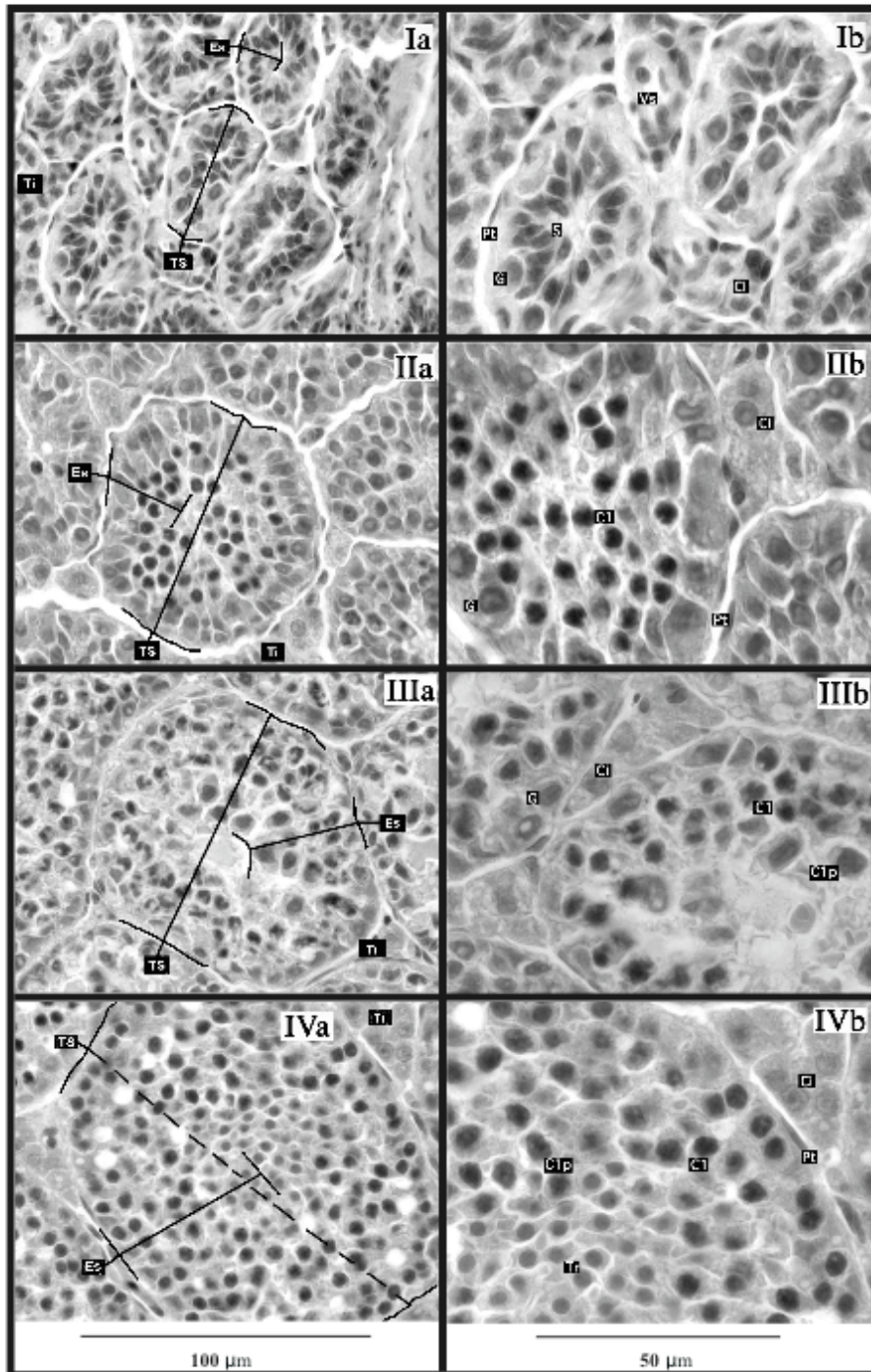


Figura 5 (fotografías Ia – IVb). Histología del testículo de murciélagos *C. mexicanus*. Secciones teñidas con H-E, vistas a 600 (a) y 1000 (b) aumentos.

Mes de captura de los murciélagos: I- enero (representativo del periodo inactivo de la espermatogénesis); II- mayo (reinicio de la espermatogénesis, fase proliferativa); III- y IV- julio (fase meiótica y comienzo de la espermiogénesis). C= espermatozoides (C1= primario, C1p= paquíteno), Ci= célula intersticial, Es= epitelio seminífero, G= espermatogonia, Pt= célula peritubular, S= célula de Sertoli, T= espermátida (Tr= redonda), Ti= tejido intersticial, Ts= túbulo seminífero, Vs= vaso sanguíneo.

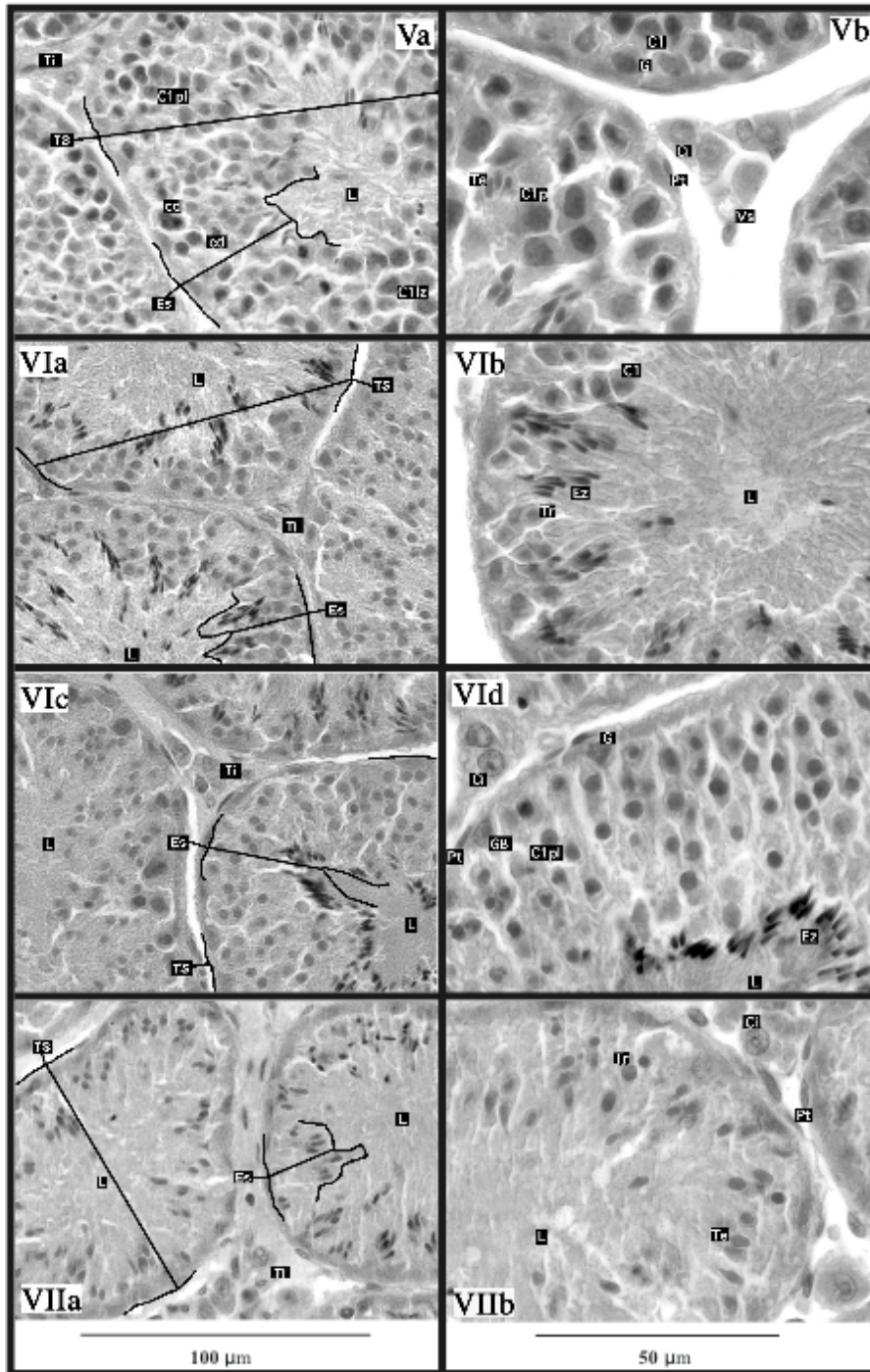


Figura 5 (fotografías Va - VIIIb). Histología del testículo de murciélagos *C. mexicanus*. Secciones teñidas con H-E, vistas a 600 (a) y 1000 (b) aumentos.

Mes de captura de los murciélagos: V- primera mitad y VI- segunda mitad de agosto (espermatogénesis completa); VII- septiembre (espermiación, fase inicial de la etapa de regresión de la espermatogénesis). C= espermatozoides (C1= primario, C1p= paquíteno, C1pl= preleptoteno), Ci= célula intersticial, Es= epitelio seminífero, Ez= espermatozoide, G= espermatogonia (GB= tipo B), L= luz del túbulo seminífero, Pt= célula peritubular, T= espermátida (Tr= redonda, Te= en elongación), Ti= tejido intersticial, Ts= túbulo seminífero, Vs= vaso sanguíneo.

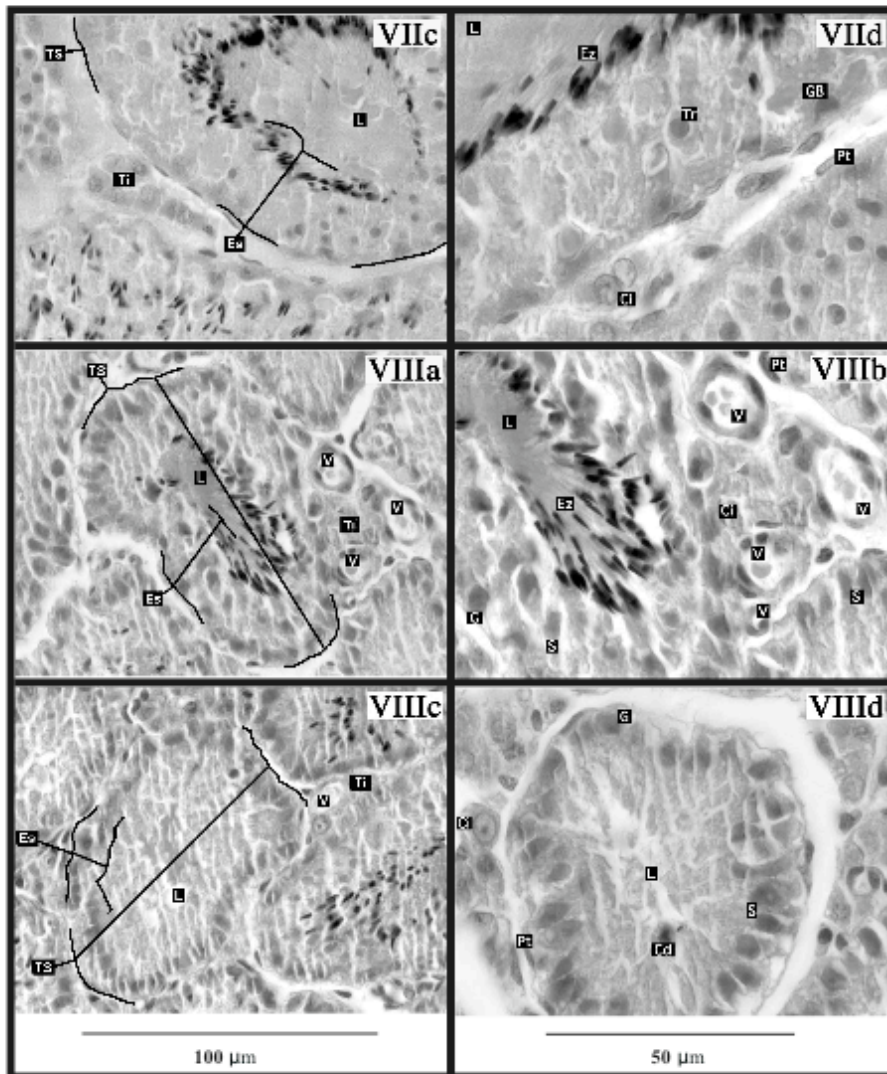


Figura 5 (fotografías VIIc - VIIIId). Histología del testículo de murciélagos *C. mexicanus*. Secciones teñidas con H-E, vistas a 600 (a) y 1000 (b) aumentos.

Mes de captura de los murciélagos: VII- septiembre (espermiación y fase temprana de la etapa de regresión en la espermatogénesis); VIII- octubre (fase tardía de la etapa de regresión y cese de la espermatogénesis). Cd= célula en degeneración, Ci= célula intersticial, Es= epitelio seminífero, Ez= espermatozoide, G= espermatogonia (GB= tipo B), L= luz del túbulo seminífero, Pt= célula peritubular, S= célula de Sertoli, T= espermátida (Tr= redonda), Ti= tejido intersticial, Ts= túbulo seminífero, V= vaso sanguíneo.

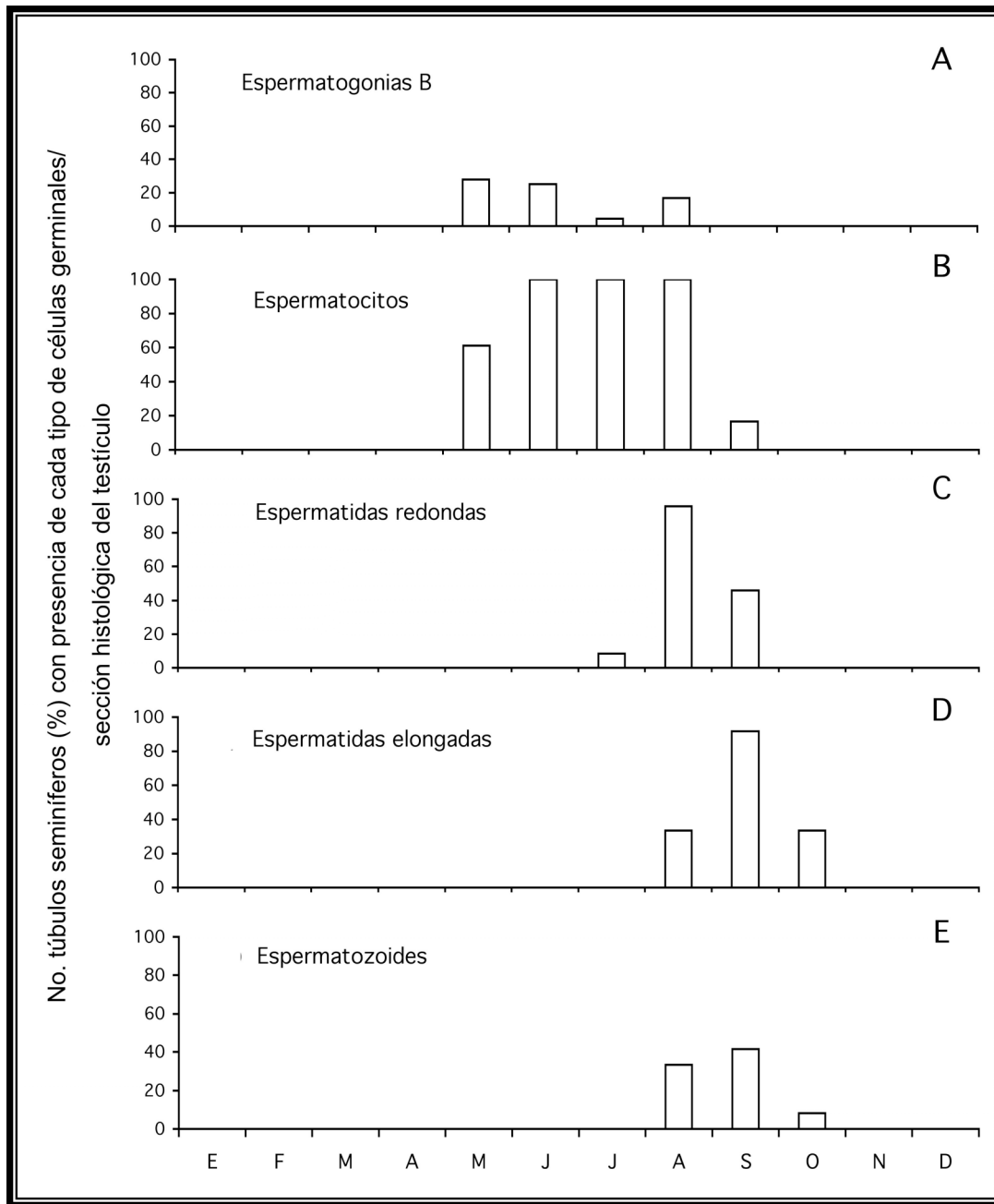


Figura 6. Cambios mensuales en la presencia de diferentes tipos celulares de la estirpe germinal en los testículos de murciélagos *C. mexicanus*. Las barras representan el porcentaje de túbulos analizados (de un total de 24 por mes) que presentaron cada tipo de célula germinal, considerando que se analizaron 6 túbulos seminíferos transversales de una sección histológica, por testículo, por murciélago. Espermatogonias A no son reportadas debido a que existen todo el año en el epitelio seminífero. En (B) se incluyen los diferentes tipos de espermatocitos.

datos obtenidos para ambos murciélagos de junio, se obtuvo un índice de apoptosis del 6.4% para el epitelio seminífero y del 45% para el tejido intersticial (figura 7), valores que resultaron ser los más altos registrados dentro del periodo en que fue detectado marcaje TUNEL(+). Debido a que en junio las únicas células germinales presentes fueron espermatogonias y espermátocitos, y por la ubicación de las marcas fluorescentes en el epitelio seminífero de los tejidos analizados, puede decirse que, para ese mes, en la poblaciones de ambos tipos de células germinales hay eliminación por apoptosis.

En los meses posteriores a junio, hubo una disminución considerable en el índice de apoptosis de ambos compartimientos del testículo. En particular, para el tejido intersticial, el porcentaje de células TUNEL(+) bajo a 15.2% y 11.7% en julio y agosto respectivamente; mientras que en septiembre el índice de apoptosis se elevó a 20.9% (figuras 7A). En el compartimiento tubular, el porcentaje de células TUNEL(+) registrado en julio fue de 1.4% (figura 7B), siendo algunas espermatogonias pero principalmente los espermátocitos y espermátidas redondas las células que presentaron marcaje positivo (figura 8-V). En agosto, índice de apoptosis del compartimiento tubular fue de 2.7% (figura 7B), observándose además algunas espermátidas en elongación marcadas como TUNEL(+) (figura 8-VI). En septiembre, aún cuando el índice de apoptosis (2.4%) fue semejante al calculado para agosto, la gran mayoría de células TUNEL(+) fueron espermátidas redondas y en elongación (figuras 7B, 8-VII).

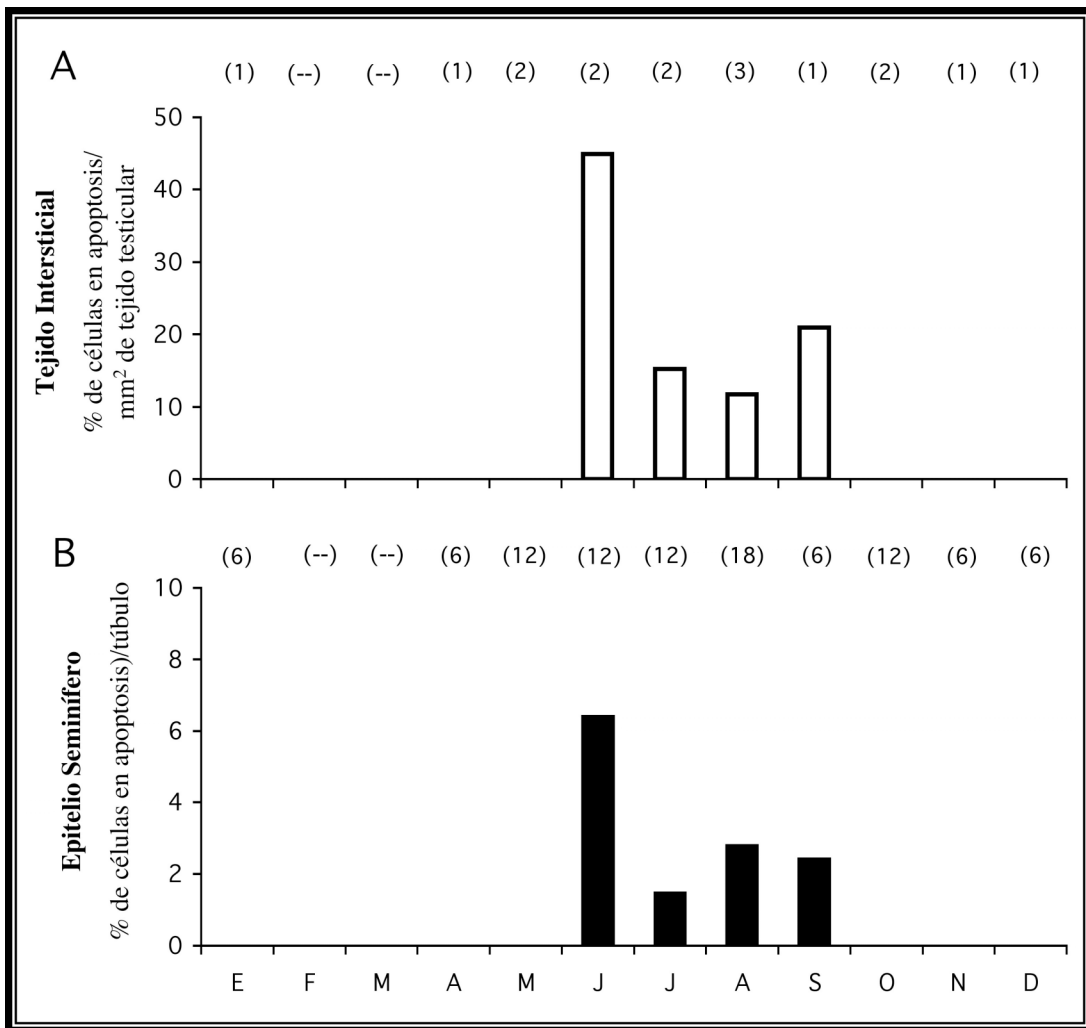


Figura 7. Variación mensual interanual del índice de muerte celular por apoptosis en tejidos testiculares de murciélagos *C. mexicanus*. (A) Compartimiento intersticial; porcentaje de células intersticiales TUNEL(+) por mm² de tejido testicular. De un testículo por murciélago se revisó el área total de una sección histológica. Se presentan los valores promedio del número de secciones de tejido analizadas por mes e indicado entre paréntesis. (B) Compartimiento tubular; porcentaje de células TUNEL(+) del epitelio seminífero por túbulo transversal. De un testículo por murciélago se utilizó una sección histológica, de la cual se revisaron 6 túbulos seminíferos. Se presentan los valores promedio del número de túbulos analizadas por mes e indicado entre paréntesis.

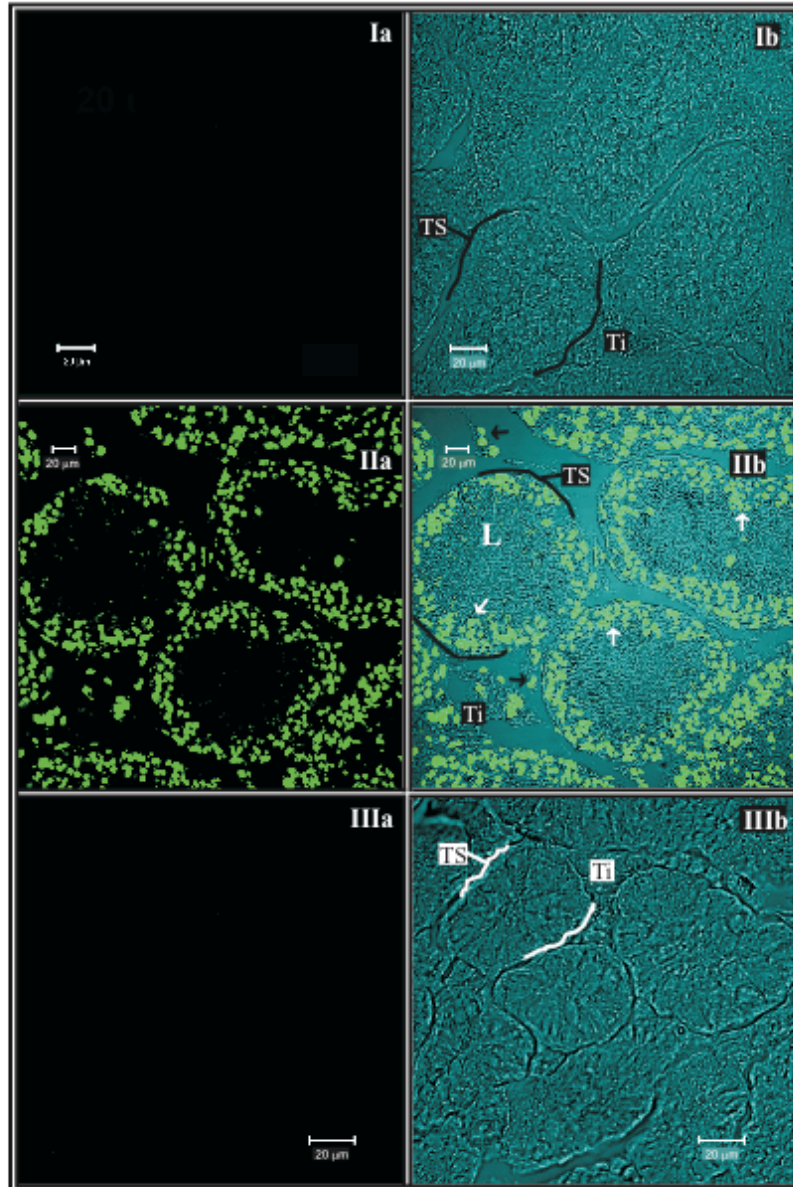


Figura 8 (fotografías Ia - IIIb). Histoquímica del testículo de murciélagos *C. mexicanus*. Tejidos procesados por TUNEL y analizados en microscopio confocal láser de barrido; (a) fluorescencia (*L.O.* de excitación = 488nm) y (b) contraste de interferencia de Normanski+ fluorescencia.

Mes de captura de los murciélagos: I- junio (control- = sin TdT), II- agosto (control+ = con DNasaI), III- enero (representativo del periodo de inactividad de la espermatogénesis). La presencia de células TUNEL(+) es indicada por flechas en negro para el compartimiento intersticial y flechas en blanco para el tubular. L= lumen, Ti= tejido intersticial, Ts= túbulo seminífero.

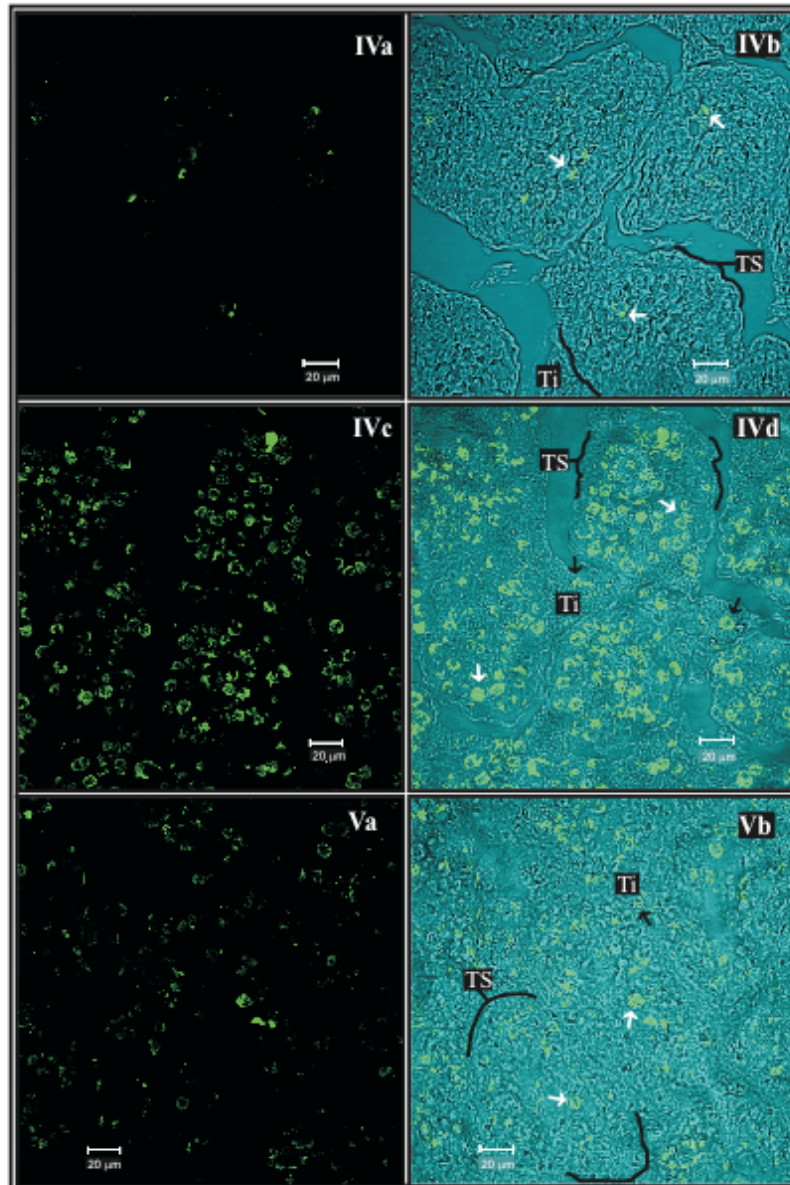


Figura 8 (fotografías IVa - Vb). Histoquímica del testículo de murciélagos *C. mexicanus*. Tejidos procesados por TUNEL y analizados en microscopio confocal láser de barrido; (a) fluorescencia (*L.O.* de excitación = 488nm) y (b) contraste de interferencia de Normanski+ fluorescencia.

Mes de captura de los murciélagos: IV- junio (fase proliferativa de la espermatogénesis; a, b = murciélago 1, c, d = murciélago 2), V- julio (fase meiótica). La presencia de células TUNEL(+) es indicada por flechas en negro para el compartimiento intersticial y flechas en blanco para el tubular. Ti= tejido intersticial, Ts= túbulo seminífero.

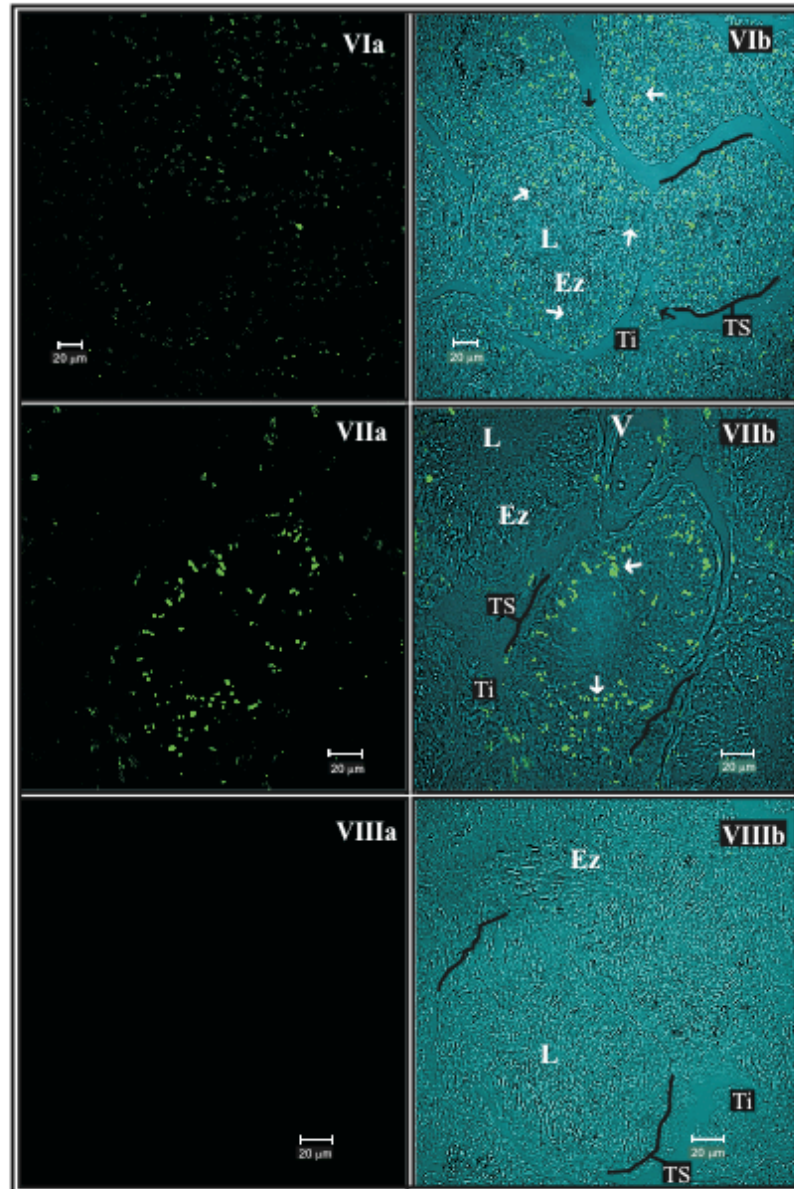


Figura 8 (fotografías VIa - VIIIb). Histoquímica del testículo de murciélagos *C. mexicanus*. Tejidos procesados por TUNEL y analizadas en microscopio confocal láser de barrido; (a) fluorescencia (*L.O.* de excitación = 488nm) y (b) contraste de interferencia de Normanski+ fluorescencia.

Mes de captura de los murciélagos: VI- agosto (espermatogénesis completa), VII- septiembre (espermiación, fase temprana de la etapa de regresión en la espermatogénesis), VIII- octubre (fase tardía de la etapa de regresión y cese de la espermatogénesis). La presencia de células TUNEL(+) es indicada por flechas en negro para el compartimiento intersticial y flechas en blanco para el tubular. Ez= espermatozoides, L= lumen, Ti= tejido intersticial, Ts= túbulo seminífero.

DISCUSIÓN.

La información obtenida sobre la posición anatómica, la apariencia y las medidas de los órganos sexuales masculinos de los murciélagos *Corynorhinus mexicanus*, permiten determinar la condición reproductiva general en que se encuentran los individuos al momento de su captura a través del ciclo anual. Con los datos provenientes de ejemplares juveniles capturados en enero-abril, fue posible estimar que el descenso testicular ocurre antes de que cumplan el primer año de vida, mientras que la maduración sexual debe iniciar cuando tienen el año completo. Esta información tiene un apoyo en el hecho de que en la población estudiada, la reactivación de las funciones reproductivas, identificada como un crecimiento significativo de los testículos en los individuos adultos, se presenta en mayo-junio, y en un estudio previo, el cual indicó que los nacimientos tienen lugar generalmente entre la última semana de marzo y la primera de abril (13).

El tiempo para la adquisición de la madurez sexual se conoce solo en unas pocas especies de murciélagos. Los machos de algunos vespertiliónidos no plecotínidos alcanzan la pubertad tempranamente, como en *Myotis nigricans*, que es entre los 2 y los 4 meses posparto (90), en *Tylonycteris pachypus* y *T. robustula* a los 3 meses (91), y en *Pipistrellus ceylonicus* a los 9 meses (92). En los plecotínidos *Plecotus auritus*, *P. austriacus* (9; 93), *C. townsendii* (16) y *C. rafinesquii* (94), que son filogenéticamente cercanos a *C. mexicanus*, es requerido un año completo para entrar en la pubertad. Puede considerarse entonces que en *C. mexicanus* el periodo de pubertad abarca de marzo a octubre, ya que los apareamientos se realizan en noviembre y diciembre.

En *C. mexicanus* hay un rápido desarrollo postnatal y a los 4 meses de edad, los juveniles adquieren la talla y peso semejantes a los del adulto (13). En el presente trabajo se estudiaron ejemplares adultos, por lo que no se esperaba un crecimiento de elementos esqueléticos ni en la masa corporal, que se viera reflejado en un aumento del peso corporal a lo largo del ciclo anual, aspecto que fue corroborado al no registrarse cambios mensuales significativos en la longitud del antebrazo de los murciélagos. Sin embargo, existieron variaciones interindividuales en las medidas somáticas y variaciones estacionales en el peso corporal de los ejemplares. En particular, las variaciones en el peso corporal deben haberse presentado puesto que en vida silvestre, las condiciones ambientales y probablemente el suministro de alimento cambian estacionalmente (15). El análisis de la relación entre el peso corporal y la longitud del antebrazo de los murciélagos adultos, fue un indicador útil para determinar su condición corporal, y las variaciones mensuales en este índice corporal, permitió contar con elementos para evaluar el estatus de los individuos, como indicador de su condición física y de salud en relación con la ejecución de los procesos reproductivos.

En *C. mexicanus* la posición de los testículos fue permanentemente inguinal. En noviembre-febrero, los individuos presentaron el mínimo peso testicular, mientras los epidídimos y las glándulas sexuales accesorias se encontraron mayormente desarrolladas. En este periodo, el peso del tracto reproductor representó apenas el 1 % del peso corporal total del animal, indicando que el escaso peso de los testículos tiene se vió reflejado en el bajo peso corporal y este a su vez en la “condición corporal pobre” de esos murciélagos. Sin embargo, el gran desarrollo del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias observado en noviembre,

implicó que los murciélagos se encontraban listos para aparearse; aspecto que concuerda con los registros de machos con la región caudal del epidídimo repletos de espermatozoides y de hembras con evidencias de inseminación en noviembre y diciembre (13, 14).

De manera contrastante, en agosto los murciélagos presentaron el máximo peso testicular, lo que se vió reflejado en un mayor peso corporal y una “condición corporal buena”. En este mes, el peso promedio de un solo testículo fue de 352 mg, es decir, ≈ 40 veces mayor que el peso de un testículo de los individuos capturados en noviembre-abril. Una relación semejante ha sido reportada para otros vespertiliónidos [*Nyctalus noctula* (10) y *Pipistrellus pipistrellus* (11)], lo que señala que la reproducción en varias especies de murciélagos estacionales de zonas frías, incluye un solo periodo de enorme producción de espermatozoides disponibles para la corta temporada de apareamiento, cuando ya no hay actividad de espermatogénesis.

El tamaño de los testículos varía entre las diferentes especies, el peso testicular aumenta varias veces en la pubertad y en algunas, hay un incremento al principio de cada estación reproductiva (18, 95). En roedores y ungulados, el peso de los testículos puede representar hasta el 1% del peso corporal (95), en el hombre y ciertas especies de monos, esta relación es menor (96), el caso extremo lo presenta un diminuto marsupial australiano (*Tarsipes spenceri*), ya que el peso testicular puede alcanzar el 5% del peso corporal (97). En *C. mexicanus*, el peso conjunto de ambos testículos de un individuo en agosto, es de 704 mg lo que equivale en promedio al 8.7% del peso corporal del animal, valor que supera lo reportado para el marsupial australiano, y debe estar en relación a su peculiar sistema de apareamiento.

Datos relativos al peso testicular son escasos para otros murciélagos plecotínidos. En *C. townsendii* de California, EUA, los testículos mas grandes fueron registrados en septiembre, cuando en promedio cada órgano pesó 377 mg (16). Para ejemplares *C. rafinesquii* de Kentucky, EUA, agosto fue el mes cuando tuvieron los testículos mas grandes (98). Es notoria la concordancia entre *C. mexicanus* y *C. rafinesquii*, ya que en agosto, ambos presentan el máximo desarrollo testicular; mientras que en *C. townsendii*, esta condición se presenta un mes después, lo que parece indicar que esta última especie presenta el patrón reproductivo ancestral para el género, aspecto que requiere ser probado con otros estudios.

El testículo en un órgano conformado mayormente por túbulos seminíferos, por ejemplo en el murciélago frugívoro de cabeza gris (*Pteropus poliocephalus*), el volumen que ocupan los túbulos es $\approx 90\%$ del volumen total del testículo (99). Los mamíferos estacionales presentan cambios en el volumen, diámetro y longitud de los túbulos, en relación con las etapas de crecimiento y regresión testiculares (22, 28). En muchas especies conocidas, el diámetro tubular fluctúa entre 200 y 350 μm , pero puede llegar al doble en algunos marsupiales dasyúridos y paramélidos de Australia (100), aunque el significado funcional de este gran diámetro tubular no es conocido.

En vespertiliónidos no plecotínidos como *Nyctalus noctula*, especie hibernante de Europa, el diámetro tubular varía de 60 a 170 μm a lo largo del ciclo anual, presentándose los valores mas altos cuando el peso testicular es máximo (10). En *Scotophilus heathi* de la India sub-tropical, el intervalo del diámetro tubular es de 88.2-182.85 μm (101). En *C. mexicanus*, el

diámetro tubular fluctuó entre 35.1 y 179.9 μm a lo largo del ciclo anual. Estos valores se asemejan a los reportados para *N. noctula* y *S. heathi*, pero a diferencia, el peso testicular en *C. mexicanus* durante la temporada activa de la reproducción, sobrepasa el correspondiente valor para las otras 2 especies de murciélagos, lo que sugiere que la longitud de los túbulos seminíferos debe ser igualmente mayor y probablemente la cantidad de espermatozoides que son producidos.

La actividad de espermatogénesis de *C. mexicanus* reinició en mayo y concluyó en la primera quincena de octubre, abarcando un periodo promedio de 5 meses y medio. Otros vespertiliónidos estacionales de zonas frías presentan también un largo periodo de actividad espermatogénica [*C. townsendii* (16), *Nyctalus noctula* (10) y *Pipistrellus pipistrellus* (11)], debido a los altos costos de energía involucrada en el crecimiento de los testículos y de las glándulas sexuales accesorias (4).

Al restar el peso del tracto reproductor del peso corporal de los murciélagos *C. mexicanus* y calcular nuevamente el índice de condición corporal (= condición corporal no reproductiva), fue notorio que los individuos que presentaron una “condición corporal buena”, fueron los capturados en mayo-junio, periodo en que reinició el crecimiento de los testículos. Estos datos permiten considerar que el reinicio de la actividad testicular está condicionada a la adquisición de una condición corporal adecuada, en apoyo a la propuesta de un mayor requerimiento de energía para la ejecución de la espermatogénesis en los murciélagos.

La duración del ciclo del epitelio seminífero y la distinción de las etapas que lo conforman no fueron precisados para el *C. mexicanus*; sin embargo, el hecho de haber observado las primeras figuras de espermatogonias en división durante el mes de mayo y las primeras espermátidas elongadas y/o espermatozoides en la segunda mitad de agosto, permite estimar de manera preliminar, que el tiempo requerido para realizar la espermatogénesis completa en esta especie debe ser de 105-120 días. De ser confirmado, el proceso de la espermatogénesis en el murciélago *C. mexicanus* superaría en duración a la del ratón y del humano, que son de 35 y 74 días respectivamente (102), y a la del megaquiróptero *P. poliocephalus*, el único murciélago del que se conoce la duración de la espermatogénesis, que es apenas mayor de 60 días (103). Las diferencias en la duración de la espermatogénesis en las especies mencionadas pueden deberse a que en el ratón y el hombre la reproducción es continua, mientras que en los murciélagos *P. Poliocephalus* y *C. mexicanus* son estacionales, pero este último, realiza, a diferencia del primero, un aletargamiento fisiológico y cuenta con separación temporal en sus funciones sexuales masculinas, lo que apunta hacia la necesidad de un mayor tiempo de maduración para que las células germinales sean transformadas en espermatozoides.

En el *C. mexicanus*, el tamaño de la población celular del epitelio seminífero presentó cambios coincidentes con las variaciones en el diámetro de los tubular de los testículos. El incremento en el número de células del epitelio, que reinició en mayo y llegó a un pico en agosto, se debió a la proliferación de las espermatogonias y espermatoцитos; mientras que la disminución en la población celular observada a partir de septiembre, fue debido al cese de la actividad proliferativa de las células germinales y a la liberación de los espermatozoides hacia el lumen

en el proceso de la espermiación. La relación existente entre las modificaciones cualitativas y cuantitativas de las células germinales y los cambios en el diámetro de los túbulos seminíferos, y a su vez, con los cambios en el tamaño de los testículos, ha sido reportado también en otros mamíferos estacionales (31, 37, 40, 41).

En la cuantificación del número de células del epitelio seminífero en *C. mexicanus* se incluyeron tanto células germinales como células de Sertoli, y no se realizó un conteo para distinguir cada tipo celular por separado, enfocado a determinar la existencia de variaciones estacionales en el número de células de Sertoli. Los datos obtenidos de los murciélagos capturados en agosto, cuando se presentó la espermatogénesis completa, indicaron que el número promedio de células del epitelio por túbulo redondo, fue 5.8 veces mayor con respecto al número de células registrado en los tejidos de individuos capturados durante el periodo inactivo de la espermatogénesis (noviembre-abril). Lo mas probable, es que estas diferencias se deban a variaciones en el número de células germinales y no en el de las células de Sertoli.

Las células de Sertoli son consideradas terminalmente diferenciadas en su forma adulta (30) y su número es estable y no es modificado por hormonas después de la pubertad (32, 33). Aunque, algunos datos contradictorios indican la existencia de variaciones temporales en el número de células de Sertoli en los adultos de unas pocas especies estacionales. Tal es el caso del caballo (36), el hámster (37), la viscacha (31), el ciervo rojo (28) y el carnero (38).

Se ha estimado que cada célula de Sertoli adulta soporta y da sustento a un número de entre 30 y 50 células germinales (104, 105). El tamaño poblacional de este tipo de célula somática determina el número de espermatozoides que pueden ser producidos (34). Por lo tanto, se puede considerar que en los individuos adultos *C. mexicanus*, no existen cambios temporales en el número de células de Sertoli; sin embargo, es importante continuar con este tipo de estudios en quirópteros estacionales, ya que representan una importante oportunidad de evaluar la existencia de cambios numéricos en las células de Sertoli entre las condiciones activa e inactiva de la espermatogénesis.

En los cortes histológicos del testículo de murciélagos *C. mexicanus* del mes de julio, se observó la presencia de espermocitos y en algunos túbulos, ocurrió la reapertura del lumen. En agosto y septiembre se registró la presencia de espermátidas alongadas y espermatozoides y en la mayoría de túbulos, el área del lumen alcanzó su valor máximo. Estas son evidencias indirectas de cambios funcionales en las células de Sertoli de esta especie.

Las células de Sertoli permiten el flujo del líquido tubular y tienen participación en su producción y secreción por regulación hormonal (106, 107, 108). El líquido tubular es indispensable para el establecimiento de un ambiente químico adecuado para la ejecución de la espermatogénesis (30), y es el componente que conforma el lumen tubular en el que son liberados los espermatozoides para su transporte hacia la rete testis y el conducto epididimario (100). Otra función de las células de Sertoli, compete al traslado de los espermocitos pre- y leptoteno del compartimiento basal hacia el adluminal del epitelio seminífero, donde llevarán a

cabo los pasos correspondientes a la reducción meiótica y la espermiogénesis; este desplazamiento celular involucra la modificación estructural de las uniones estrechas inter-Sertoli en la barrera hemato-testicular (34, 107, 109, 110).

Las espermátidas también contribuyen con una porción del fluido que es movilizado por las células de Sertoli hacia el lumen tubular, en un mecanismo que no es completamente conocido. Esta contribución se debe a la pérdida de agua que experimentan las espermátidas redondas por la condensación del citoplasma y del núcleo durante la espermiogénesis (111), y al desprendimiento del cuerpo residual de cada espermátida madura al momento de la espermiación (112). En ambos casos, las estructuras desprendidas de las espermátidas son fagocitadas y degradadas enzimáticamente por las células de Sertoli, y es probable que parte del líquido resultante fluya hacia el lumen, propiciando, un aumento en el volumen de la luz tubular.

En la rata, el lumen tubular aparece en la pubertad y continúa incrementando en diámetro hasta que el animal ha alcanzado los 60 días de edad (113, 114). En individuos maduros, el lumen tiene un diámetro de entre 50 y 100 μm a lo largo de toda la longitud del túbulo seminífero (115), y se incrementa cerca del doble justo en la zona donde los espermatozoides son liberados (113, 116). En los machos adultos de algunos roedores estacionales, el tamaño del lumen tubular presenta importantes variaciones temporales. Por ejemplo, durante la regresión testicular en el hámster dorado, el diámetro del lumen disminuye considerablemente en relación con una disminución en la tasa de flujo del líquido tubular (22). En el mink (117) y

la viscacha (118), los testículos presentan modificaciones estructurales en las uniones estrechas inter-Sertoli de manera temporal, en relación con variaciones en el tamaño del lumen tubular entre las etapas de espermatogénesis completa y la de máxima regresión testicular.

Para el murciélago *C. mexicanus*, la reapertura del lumen tubular observada a partir del mes de julio, debe tener relación con un incremento en el flujo de líquido tubular regulado por acción hormonal; la presencia de espermatoцитos, indica la existencia de modificación en las uniones estrechas que conforman la barrera hemato-testicular, permitiendo con ello, su trásmigración hacia el compartimiento adluminal del epitelio seminífero. La presencia de espermátidas elongadas y de espermatozoides a partir de la segunda mitad de agosto, implica la extrusión de agua de las espermátidas durante su proceso de maduración y en la espermiación, en relación directa con la necesidad de gran cantidad de fluido para el transporte de los espermatozoides hacia la rete testis y de ahí hacia el epidídimo. esto puede explicar el por que se registró una mayor área luminal de los túbulos en agosto y septiembre. Esto puede explicar el por que se registró una mayor área luminal de los túbulos en agosto y septiembre.

En septiembre comenzó la involución testicular en los murciélagos *C. mexicanus* y a partir de octubre hubo una disminución gradual del área del lumen tubular hasta cerrarse por completo en enero-febrero. El mínimo desarrollo testicular se presentó en noviembre, y aunado a la notoria disminución en el área del lumen tubular, fue a partir de este mes, cuando los murciélagos se encontraron en receso total de la espermatogénesis. En contraste, cuando se inicia la involución testicular, para el *C. mexicanus* la región caudal del epidídimo presenta su

máximo desarrollo, hecho que es notorio por el enorme hinchamiento y la coloración blanquecina que adquiere este órgano reproductivo; lo que sugiere el congestionamiento con espermatozoides de la cola epididimaria. También, a partir de la segunda mitad de octubre, el tamaño de las glándulas ampulares y de la próstata presentó un importante incremento. Estos datos en conjunto indican que la temporada de copulación en los murciélagos *C. mexicanus* está delimitada a los meses de noviembre y diciembre.

En los murciélagos de zonas frías, el apareamiento generalmente comienza a finales del verano o al principio del otoño dependiendo de la especie, y para la mayoría, las cópulas se llevan a cabo a partir del segundo mes del otoño (3, 4).

El haber registrado el menor diámetro de los túbulos seminíferos y un epitelio germinal conformado únicamente por células de Sertoli y espermatogonias en los testículos de murciélagos *C. mexicanus* a partir de noviembre, sustentan el hecho de que en esta especie, las inseminaciones se realizan con el reservorio de espermatozoides almacenados en la cauda del epidídimo, sin nuevos aportes del testículo.

Si bien los órganos reproductores son dependientes de hormonas, hasta este momento no se cuenta con información correspondiente a la actividad endocrina del testículo de murciélagos *C. mexicanus*, con la cual se pudieran establecer relaciones con los cambios morfológicos de los testículos y de los órganos sexuales secundarios. La cuantificación del número de células intersticiales a lo largo del ciclo anual permite generar algunas consideraciones indirectas al

respecto y plantear supuestos para, en futuros estudios, caracterizar el ciclo de cambios en la concentración de las principales hormonas sexuales (como la testosterona), y el papel de estas hormonas en el patrón reproductivo masculino de la especie.

El menor el número de células intersticiales fue registrado para los murciélagos capturados en noviembre-enero, periodo de inactividad espermatogénica. Mientras que, el mayor número de células intersticiales fue registrado en junio y en agosto, meses cuando se lleva a cabo, la meiosis en los espermatocitos y la espermatogénesis completa respectivamente. De confirmarse con estudios endocrinológicos, los datos anteriores apuntan hacia la existencia de una relación positiva entre el aumento en el tamaño de la población celular del compartimiento intersticial y la actividad endocrina de las células de Leydig, para el desarrollo de la espermatogénesis, pero no explican el mantenimiento de las funciones secundarias (maduración y almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo, y producción del fluido seminal por parte de las glándulas ampulares y la próstata).

Para algunos mamíferos estacionales, durante los ciclos circanales de crecimiento e involución testiculares, ocurren diversos cambios en el tejido intersticial (18 19). Esos cambios implican principalmente, variaciones en la actividad esteroideogénica, modificaciones estructurales, cambios en el volumen de los vasos sanguíneos, del tejido intersticial como un todo y en algunos casos, en el volumen de las células de Leydig y de los macrófagos (16, 22). En ciertas especies, se han descrito además, eventos de desdiferenciación-rediferenciación de las células de Leydig (24).

En el hámster Sirio (22), el hyrax de las rocas (20) y el caballo (119), el testículo retrocedido presenta un número menor de células de Leydig con respecto al órgano activo. Sin embargo, otros estudios contradictorios realizados también en el hámster (26) y en el carnero soay (38), no se reportan variación estacional en el número de células de Leydig en animales reproductivos vs los no reproductivos. De manera que, no es claro si hay diferencias generalizadas en cuanto al número de células de Leydig para los mamíferos con reproducción estacional o si las diferencias son especie-específicas. Sin embargo, estudios autorradiográficos demuestran la existencia de renovación de células de Leydig durante la recrudescencia testicular inducida artificialmente en el hámster (25, 26); la fuente adicional de células de Leydig puede ser explicada por la proliferación y subsiguiente diferenciación de células intersticiales precursoras (22).

Los resultados obtenidos respecto al número de células intersticiales del testículo en el *C. mexicanus*, son congruentes con los correspondientes datos reportados para otros mamíferos estacionales en los que existe variación entre la condición activa e inactiva del testículo; pero son limitados, debido a que para el *C. mexicanus* no se realizó una distinción entre los diferentes tipos celulares que conforman el tejido intersticial (células de Leydig y células del mesenquima como, los fibroblastos y los mastocitos), por lo que no es posible determinar con precisión, la existencia de variaciones numéricas en la población de células de Leydig para este quiróptero.

En términos generales, se considera que la testosterona es un requerimiento absoluto para la espermatogénesis, pero este es un proceso complejo y actualmente se reconoce que la participación conjunta de las gonadotrofinas y los andrógenos controlan su inicio y mantenimiento en todos los mamíferos estudiados, y para las especies estacionales, ambos tipos de hormonas regulan el reinicio de la espermatogénesis después de su regresión natural o inducida experimentalmente (30).

En primates y en la rata un elevado nivel de testosterona y/u otros factores diferentes producidos por las células de Leydig, son necesarios para el reclutamiento normal de las espermatogonias, y se reconoce que el papel predominante de la testosterona parece darse durante la espermiogénesis, al estimular la maduración de las espermátidas redondas a elongadas (120, 121, 122, 123). La acción de la FSH es clave para estimular la progresión de las espermatogonias de tipo A al B, en la meiosis, y estimula la capacidad secretora de las células de Sertoli, en las que además, tiene un efecto en el arreglo citoesquelético necesario para el mantenimiento de la barrera hemato-testicular y la adhesión celular (122, 123, 124). La liberación de las espermátidas maduras en la espermiación, se encuentra bajo el control sinérgico de FSH y testosterona (122).

En los mamíferos estacionales, la concentración de testosterona plasmática es mayor durante el periodo de espermatogénesis (73). Esta misma relación se ha observado para la mayoría de quirópteros que han sido estudiados pero en las especies estacionales, se reportan diversas variantes al respecto. Un modelo endocrino particular registrado para varias especies de

vespertilionidos hibernantes es el observado en *Myotis lucifugus* (de ~ 40°N, en EUA), especie que presenta cambios coordinados entre el incremento del tamaño testicular, la espermatogénesis, la actividad de las células de Leydig y la concentración de testosterona y de globulina plasmática unidora de esteroides (6). Una ligera variante a este modelo sincrónico se ha reportado para un miembro de la familia Rhinolophidae, el murciélago de herradura del Cabo *Rhinolophus capensis* (de 33.5°S, en Sud África), que también es hibernante, pero a diferencia del primero, la testosterona periférica es baja y solo presenta un pico durante la parte tardía del periodo de espermatogénesis (6). Otra variación se reporta el vespertilionido *Scotophilus heathi* de la India subtropical, para el que una alta concentración de androstendiona circulante y el pico de testosterona plasmática están asociados particularmente con la ronda inicial de espermatogénesis (101). Pero una situación completamente diferente se ha reportado para microquirópteros australianos, como el molossido *Mormopterus planiceps* (en los 36°S) y el emballonúrido *Taphozous georgianus* (~24°S), que no son hibernantes pero que tienen la capacidad de reducir grandemente su metabolismo durante el invierno. Estas especies cuentan con un ciclo único y largo de espermatogénesis, en el que al inicio, los andrógenos (androstendiona y testosterona en *M. planiceps*; androstendiona, dihidrotestosterona y testosterona en *T. georgianus*) en su conjunto exhiben un aumento y un pequeño pico en la testosterona plasmática que coincide con el máximo tamaño de los testículos; sin embargo, la regresión testicular ocurre a pesar de la elevada concentración de los andrógenos en su conjunto (6).

Aunado a la variación en los modelos endocrinos que se han descrito para diferentes grupos de murciélagos, está la existencia de especies, principalmente aquellas que habitan en zonas frías, que cuentan con una asincronía temporal de sus funciones sexuales masculinas; tal es el caso del murciélago *C. mexicanus*. Para ciertas especies que tienen el patrón asincrónico de reproducción se ha visto que en el invierno, cuando la espermatogénesis se encuentra en receso, los niveles de andrógenos son bajos, mientras que las funciones sexuales secundarias son mantenidas (3, 6).

Es importante considerar la información existente para los mamíferos no quirópteros, sobre la contribución que tienen los andrógenos 5- α reducidos en la regulación de la espermatogénesis. Se conoce que estos andrógenos son mantenidos durante la supresión de gonadotrofinas y pueden actuar para mantener bajos niveles de desarrollo de las células germinales (123). En particular, la dihidrotestosterona (DHT) tiene el doble de afinidad y una tasa de disociación 5 veces mas lenta por el receptor a andrógenos comparativamente con la testosterona (125, 126). Sin embargo, su abundancia relativa en el testículo normal, es 5 veces mayor que la de DHT; por lo que es común que la testosterona sea el ligando predominante para el receptor de andrógenos (127). La DHT tiene un papel en la espermatogénesis normal pero este papel llega a ser mas importante cuando los niveles de andrógenos intratesticulares son reducidos experimentalmente (128). Bajo esta condición, la DHT puede restaurar la espermatogénesis incluso cuando su nivel intratesticular es de aproximadamente un 50% del correspondiente para la testosterona, en concordancia con su alta afinidad al receptor de andrógenos (128).

El patrón reproductivo masculino del *C. mexicanus* se asemeja al de especies de zonas frías en las cuales, las células de Leydig tienen una completa involución al inicio del periodo de apareamiento, o bien probablemente se mantienen en un nivel bajo de actividad durante el traslape entre el periodo de apareamiento y el de la hibernación. Por lo tanto, es importante realizar nuevos estudios para evaluar los cambios morfológicos y numéricos de las células intersticiales, particularmente de las células de Leydig en el murciélago *C. mexicanus*, complementado con la cuantificación de los principales andrógenos (incluyendo testosterona, androstendiona y DHT) para tratar de explicar el mantenimiento de las funciones sexuales secundarias durante la parte del otoño-invierno cuando el testículo se encuentra en su mínimo desarrollo. Así mismo, es necesario explorar las diversas fuentes de andrógenos, incluyendo a la grasa café.

En los murciélagos *C. mexicanus* estudiados, hay eliminación celular por apoptosis (células positivas a TUNEL) en ambos compartimientos del testículo (intersticial y tubular), un mes después de reiniciada la actividad de espermatogénesis y continúa, incluyendo la parte inicial de la involución testicular. Para ambos compartimientos del testículo, junio fue el mes en que se presentó el mayor índice de apoptosis. No se detectaron células TUNEL(+) en la parte final de la regresión testicular, durante el periodo de inactividad espermatogénica, al reinicio de esta actividad en los murciélagos.

Las evidencias observadas durante el ciclo anual en el epitelio seminífero de los murciélagos *C. mexicanus*, descartan la posibilidad de que algunas células de Sertoli fueran eliminadas por

apoptosis; sin embargo, esta posibilidad no puede ser desechada por completo, debido a que se considera que todas las células nucleadas contienen un programa suicida interno que, sobre la estimulación por señales apropiadas, pone en funcionamiento la apoptosis (52).

En agosto se registró el mayor número de células y un bajo índice de apoptosis en el tejido intersticial; mientras que en septiembre, hubo un incremento en el índice de apoptosis, cuyo efecto se vió reflejado dos meses después, ya que a partir de noviembre se registraron los valores mas bajos en el número de células intersticiales. Lo que sugiere la existencia de un comportamiento cíclico de recambio celular en el tejido intersticial para el *C. mexicanus*.

El testículo es un órgano que se caracteriza por un importante recambio celular durante el periodo activo de la espermatogénesis, siendo las células de la estirpe germinal quienes experimentan dicho recambio. En el caso de células somáticas, como las células de Leydig en el compartimiento intersticial y las células de Sertoli en el compartimiento tubular, son escasos los reportes que indican la existencia de recambio celular en el individuo adulto.

Estudios realizados en la rata, indican que el número de células de Leydig que experimentan apoptosis es inadvertible una vez que el individuo ha llegado a la pubertad (58). En el hombre, el testículo cursa por un vigoroso crecimiento previo a la pubertad, el cual parece estar relacionado con disminución de la apoptosis en las células de Sertoli (129). En la pubertad estas células no presentan evidencias de fragmentación de DNA (58). En el individuo adulto,

las células de Sertoli son notables por su resistencia a estímulos que inducen la muerte en otros tipos de células somáticas del testículo (35), incluyendo la hipofisectomía (130).

En quirópteros, solo hay un reporte en el que se presentan evidencias de apoptosis en células testiculares, es el caso de *Miniopterus inflatus*, una especie estacional, pero su estudio fue limitado al periodo de letargo sexual de los individuos, que es cuando ocurre la regresión testicular, notándose que las células de Leydig presentaron núcleo esferoide, predominantemente eucromático, citoplasma denso con gotas lipídicas, mitocondrias esféricas y otros organelos pobremente definidos (84). También se observaron macrófagos con evidencias de fagocitosis de lo que probablemente fueran células intersticiales. Estos aspectos indicaron la existencia de muerte celular por apoptosis en el compartimiento intersticial (84). Además, la presencia de ocasionales espermatogonias y espermatocitos, algunos de ellos con cariólisis y desintegración de sus membranas y organelos (retículo endoplásmico liso), y la presencia de vesículas dispersas y numerosas gotas lipídicas en el citoplasma apical de las células de Sertoli, indicativos de fagocitosis, fueron evidencia de apoptosis en el compartimiento tubular del testículo en *M. inflatus* (84).

La existencia de eliminación de células germinales durante la etapa completa de regresión testicular en *M. inflatus*, difiere de los resultados obtenidos para el *C. mexicanus*, donde solamente se detectaron evidencias de apoptosis en la parte inicial de la etapa de regresión del testículo. Estas diferencias pueden deberse a que el patrón reproductivo masculino general de los miniopterínidos, no es asincrónico, ya que los apareamientos se realizan previo a la

temporada de aletargamiento invernal, y la actividad testicular y de los órganos sexuales secundarios, termina justo antes del periodo invernal (84). En *C. mexicanus*, el patrón reproductivo es claramente asincrónico, por lo que es probable la existencia de un mecanismo para prevenir la muerte de las células germinales para mantenerlas viables hasta su total maduración y almacenamiento en el epidídimo, y contar con un depósito espermático suficiente para las cópulas que ocurren durante noviembre-diciembre, cuando se presenta el aletargamiento invernal.

La importancia del mantenimiento de una población estable de células de Sertoli en el testículo sexualmente maduro, se debe a que cada célula tiene una capacidad fija para el número de células germinales a las que puede dar soporte (131), capacidad que varía entre las especies (30) pero que en general es limitada (42). El número de células de Sertoli determina tanto el tamaño testicular como la producción diaria de espermatozoides (30), por lo que su eliminación debe ser un fenómeno estrictamente controlado, manteniendo inactivo su programa suicida interno; control que puede disminuir hacia la etapa senil como ocurre en caballos (132) y en hombres (133, 134), donde se ha reportado una disminución en el tamaño poblacional de las células de Sertoli asociado al envejecimiento. En las especies estacionales de las que se tienen evidencias de cambio en el tamaño de la población de células de Sertoli, la eliminación celular debe ser balanceada por actividad proliferativa, evitando con ello, una disminución en la capacidad de producción de espermatozoides.

El desarrollo normal de la espermatogénesis requiere de un adecuado cociente numérico entre células de Sertoli y células germinales. Se ha calculado que durante la espermatogénesis una sola espermatogonia podría generar hasta 256 espermatozoides; sin embargo, entre el 25 y el 75% de las células germinales son eliminadas de manera natural en diferentes etapas de su desarrollo (43, 44), siendo la apoptosis el mecanismo principal de eliminación (45, 46, 47, 48, 49, 50, 51).

En la pubertad, una eliminación masiva de espermatogonias por apoptosis es importante para el desarrollo funcional de la espermatogénesis (60), mientras que en el individuo adulto la ocurrencia de apoptosis entre las espermatogonias es esporádica (60, 61). Estos datos resultan de importancia al considerar el índice de apoptosis registrado para el epitelio seminífero de los 2 murciélagos *C. mexicanus* estudiados durante el mes de junio de este trabajo; donde uno de ellos presentó un elevado porcentaje de células TUNEL(+) comparativamente con el correspondiente valor para el otro murciélago estudiado. Es probable que el primer murciélago mencionado, estuviera en el inicio de su vida reproductiva, con una edad estimada de entre 14 y 15 meses y por tanto, estuviera cursando su primera ronda de espermatogénesis. En el segundo caso, el individuo debió tener 2 años de edad o más, y por tanto, estuviese cursando el reinicio de una nueva actividad espermatogénica, lo que explicaría por que presentó un bajo índice de apoptosis.

El proceso de conversión de las espermatogonias en espermatozoides maduros, involucra un balance fino entre la proliferación y la muerte celular (135). Estudios en la rata indican que las

espermatogonias tipo A_{2-4} , los espermatocitos primarios, los secundarios y por último las espermatidas, son los tipos celulares de la estirpe germinal que experimentan apoptosis en un orden descendente; mientras que las espermatogonias tipo A_{1-2} , las intermedias y las de tipo B, raramente degeneran (43, 46, 48, 49, 50, 58, 62, 136).

En los mamíferos estacionales, la eliminación de células germinales por apoptosis juega también un papel central en la regresión natural del testículo (137, 138). Las evidencias histológicas y el no haber detectado células TUNEL(+) en el epitelio seminífero de los murciélagos *C. mexicanus* capturados en la parte final del periodo de regresión testicular (octubre) y durante el periodo completo de inactividad espermatogénica (noviembre-abril), permiten considerar que en octubre, las espermatidas se encuentran en su fase final de maduración y son liberadas de la célula de Sertoli hacia el lumen tubular, en el proceso de espermiación. Las espermatogonias que permanecen poblando el epitelio seminífero, deben corresponder a las que no experimentan apoptosis, como las del tipo A_{1-2} , las intermedias y las B reconocidas para la rata. También deben permanecer las células madre espermatogonias que mantienen el reservorio de células germinales; estas últimas, en los mamíferos no primates corresponden al tipo A_s (*single*) (139, 140, 141, 142), las cuales a su vez, proliferaran y se diferenciaran al reinicio de la siguiente ronda de espermatogénesis. Es importante mencionar que para los murciélagos, son pocos los trabajos donde se describen diferentes tipos de espermatogonias en el testículo adulto. En el megaquiróptero *Pteropus poliocephalus*, se distinguieron las espermatogonias A, intermedias y B, pero no se reportan los diferentes subtipos de espermatogonias A, probablemente por que no existan (103). También en el *P.*

poliocephalus ocurre una pérdida significativamente mayor de células germinales en los testículos involucionados, comparativamente con la estación reproductiva; presentándose esta pérdida de células germinales principalmente durante el periodo final de la etapa de división de las espermatogonias y durante la fase de meiosis en los espermatocitos, aunque no se determinó por que tipo de proceso fueron eliminadas esas células (99).

En *P. poliocephalus* la estación reproductiva se lleva a cabo en el otoño, cuando los individuos presentan valores máximos en el tamaño testicular, en el nivel de testosterona plasmática y la fertilidad es óptima, aunque, algo de producción de espermatozoides se presenta en el periodo cuando los testículos se encuentran involucionados (99). De manera diferente, en *C. mexicanus* cuando el testículo se encuentra involucionado, no hay ninguna actividad de espermatogénesis.

Durante la regresión testicular en el murciélago *P. poliocephalus* se observaron varios espermatocitos primarios en paquiteno y espermatidas redondas, tanto en la luz de los túbulos seminíferos, como en la del segmento inicial del epidídimo (99). El desprendimiento de células germinales inmaduras podría deberse a la pérdida de la adhesión celular causado por la caída natural en los niveles de FSH y de testosterona, pues se ha visto que la disminución experimental de la concentración sérica de FSH y/o de testosterona en ratas, propician el desprendimiento de las espermatidas redondas ancladas a las células de Sertoli, lo que resulta en la liberación de las espermatidas hacia el lumen tubular y su aparición en el epidídimo, dirigiendo así a la interrupción de la espermatogénesis (124). Adicionalmente, en el

murciélago filostómido *Artibeus lituratus* se ha reportado la presencia de células germinales inmaduras con signos de apoptosis en la luz del túbulo epididimario, sugiriendo que dichas células podrían haber entrado en la fase inicial de la apoptosis poco antes de ser liberadas del epitelio germinal y ser transportadas hacia el epidídimo donde culminan con el proceso de muerte (143).

Los datos referentes al número de células del epitelio seminífero y el índice de apoptosis en el compartimiento tubular del testículo en los murciélagos *C. mexicanus*, indican que la regresión testicular en este quiróptero es un proceso complejo que se realiza en dos fases: una fase inicial en la que tiene participación la eliminación de células germinales por apoptosis, y una segunda donde la espermiación y el transporte de espermatozoides hacia el epidídimo, así como el cese de la actividad espermatogénica, son los factores que participan en la reducción del diámetro tubular y por ende, en el tamaño del testículo. La reducción en los niveles circulantes de hormonas (FSH/testosterona) en el organismo podrían tener un impacto en la liberación de células germinales inmaduras por lo que es importante la realización de estudios endocrinológicos apropiados para corroborarlo.

Al término de la regresión, los testículos de los murciélagos *C. mexicanus* experimentan una profunda disminución en tamaño y peso, quedando muy cercanas a las correspondientes medidas testiculares de los individuos juveniles.

Algunas especies de quirópteros presentan migración estacional de los testículos, del escroto hacia una posición intra-abdominal, y con ello, el detenimiento de la espermatogénesis (3). En general, en los mamíferos escrotales, la temperatura intra-testicular es varios grados centígrados por debajo de la temperatura corporal interna, y se ha visto que el proceso de la espermatogénesis es dependiente de la baja temperatura del escroto (144).

El caso extremo del efecto que tiene la temperatura corporal sobre la fisiología del testículo, se presenta en la criptorquidia, patología que propicia una caída en la concentración testicular de testosterona (145, 146), un incremento de la apoptosis en células germinales y finalmente la interrupción de la espermatogénesis (69, 70, 71, 72). Cuando se provoca el retiro de la testosterona, hay un aumento de la apoptosis en células germinales (147, 148). La temperatura a la que está sometido el testículo criptorquídico afecta también la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), propiciando con ello, un desbalance en los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs), que al elevarse, generan un estrés oxidativo. Consecuentemente, las EROs peroxidan a los componentes estructurales de las células, entre los que destacan los lípidos y se estimula la apoptosis (149).

Corynorhinus mexicanus puede considerarse como una especie escrotal, ya que en los individuos adultos, pero a diferencia de otros mamíferos escrotales, los testículos están adosados a la cara interna de los muslos y no son pendulares. Además, es importante recalcar que para este trabajo, solo se estudiaron animales normales, por lo que los efectos de la criptorquidia son descartados. Sin embargo, asociado a los grandes cambios estacionales en el

tamaño de los testículos de estos murciélagos, es probable que ocurran variaciones en la temperatura intratesticular, que tengan efectos sobre las funciones que caracterizan a estos órganos sexuales. Estos efectos serían observados en septiembre, cuando se lleva a cabo la parte inicial de la involución testicular, un ligero incremento en la temperatura de los testículos podría entonces ocasionar una disminución en la concentración intratesticular de testosterona; lo que podría explicar, por una parte, la liberación de las espermatogonias maduras hacia el lumen tubular, y el aumento en el índice de apoptosis en células germinales inmaduras y en células intersticiales. Al continuar la reducción del tamaño testicular en octubre (parte final del periodo de involución testicular), podría propiciarse un nuevo aumento de la temperatura y con ello, mayor reducción en el nivel de testosterona y finalmente, el fin de la actividad espermatogénica. La ausencia de células TUNEL(+) en los tejidos testiculares de los individuos de octubre, apunta hacia una modulación fina por parte de mecanismos que evitan la apoptosis, para mantener una población de células germinales que reiniciarán la actividad de espermatogénesis en la primavera siguiente.

Los murciélagos *C. mexicanus* tienen la capacidad de realizar un aletargamiento fisiológico (torpor diario) durante la temporada fría del año. Estos murciélagos son de hábitos nocturnos, y durante el día, cuando se encuentran dentro del refugio (el túnel), la oscilación anual de la temperatura ambiental interna del refugio, permanece entre los 9° y los 12°C, siendo junio el mes más caliente y febrero el más frío; mientras que en condición de letargo, la temperatura corporal de los murciélagos es solo $\approx 2^\circ\text{C}$ mayor que la temperatura ambiental (13). La baja temperatura del refugio, asociado a la reducción de la temperatura corporal que presentan los

murciélagos en los meses invernales, puede funcionar como un amortiguador para evitar la elevación de la temperatura intratesticular durante el periodo en que los testículos tienen el tamaño mínimo (noviembre-abril), y con ello, la inhibición de la apoptosis. Por otra parte, la temperatura media ambiental de la zona geográfica donde se encuentra el refugio de los murciélagos, comienza a elevarse en el mes de abril, y en junio, el mes mas cálido, se encuentra entre los 15.5°-16°C (13, 15). En *C. mexicanus*, la espermatogénesis y el crecimiento testicular reinician en mayo pero para el mes de junio, debido a que los testículos todavía son de tamaño pequeño, es probable que la cercanía de estos órganos al cuerpo, los mantenga en una mayor temperatura, propiciando el inicio y mayor índice de apoptosis registrado en ambos compartimientos testiculares.

Una explicación pertinente para la modulación interna de la apoptosis en el testículo del *C. mexicanus* puede darse a partir de los siguientes conocimientos. Una elevada actividad metabólica del testículo, que es soportada por hormonas, durante la espermatogénesis, puede generar altos niveles de EROs (150). Los espermátocitos en paquiteno, las espermátidas redondas y los espermatozoides contienen entre un 38 y 56% mas actividad SOD que las células somáticas (151). Los espermatozoides epididimarios producen una gran cantidad de $O_2^{\cdot -}$ en la mitocondria y la membrana plasmática (por actividad de NADPH oxidasa), seguido de la generación de H_2O_2 como producto de la actividad de SOD (152, 153, 154).

Las enzimas antioxidantes participan en el mantenimiento de la viabilidad celular pues se ha demostrado que la SOD evita la apoptosis durante la exposición del testículo a estrés calórico

(65) y por criptorquidia (155). La glutathion peroxidasa citosólica (GPX1) previene la apoptosis inducida por estrés oxidativo en células renales, y en este mismo modelo, la CAT compensa cuando hay agotamiento de GPX para un cierto nivel de degradación del H_2O_2 (156).

El testículo de los mamíferos presenta altos niveles de PHGPX, expresada preferentemente en la capa de espermatidas redondas (63, 157). En la rata, la actividad testicular de SOD es similar al nivel reportado para el hígado; mientras que la actividad de GPX y la de CAT, representan solamente el 5 y el 2% respectivamente, con respecto a la actividad en hígado (65). Las células germinales masculinas de la rata y del humano, expresan importantes actividades de Cu/Zn SOD y Mn-SOD; mientras que las células de Leydig, las células mioides peritubulares y las células de Sertoli presentan niveles importantes de SODs, GPX (63, 151, 158) y CAT (159).

Los testículos de murciélagos adultos *C. mexicanus* presentan una baja actividad de SOD durante la etapa de receso testicular, la actividad incrementa a partir de abril y se mantiene alta durante mayo-julio para disminuir en agosto, la actividad de CAT es bimodal, con un pico de mayor magnitud al reinicio del crecimiento testicular; mientras que las actividades de GPX y de gama-glutamyl transpeptidasa (GGT) presentaron comportamientos en paralelo con el ciclo anual de cambios en el peso de los testículos (160). La GGT es esencial para el metabolismo del GSH y tiene relación con el sistema de la GPX hacia la detoxificación del H_2O_2 (161, 162, 163).

Por lo tanto, compaginando con la información sobre la actividad de las enzimas antioxidantes reportada en la literatura para diferentes mamíferos, con los datos obtenidos y reportados en (160), se puede decir que con el incremento de la actividad de SOD el testículo del *C. mexicanus* observado en abril, la correspondiente producción de H_2O_2 podría estar relacionado con la estimulación de la proliferación y el crecimiento de las espermatogonias en mayo. De hecho, estudios *in vitro* han permitido observar que un bajo nivel de oxidantes insuficiente para generar estrés oxidativo, tiene efectos positivos sobre el crecimiento, activación, proliferación (164, 165, 166) y la diferenciación celular (167). La mayor actividad de CAT en el periodo de recrudescencia testicular (mayo) debe disminuir la concentración del H_2O_2 , evitando con ello, la afectación peroxidativa de las espermatogonias, lo que explicaría el hecho de no haber sido detectadas células TUNEL(+) en el epitelio seminífero de los tejidos testiculares correspondientes al mes de mayo. Tan solo un mes después, en junio, el incremento en el número de espermatogonias y el sostenimiento de la actividad metabólica relacionado con la proliferación celular, debió causar la elevación en los niveles de EROs que propiciara un estrés oxidativo lo suficientemente elevado para disparar la apoptosis en un importante número de espermatogonias y espermatocitos. El estrés oxidativo que propiciara el aumento en la apoptosis observado en junio podría explicarse por el aumento progresivo de la actividad SOD en el periodo de mayo a julio, lo cual pudo dirigir a su vez a un mayor aumento del H_2O_2 .

Con la revisión de los tejidos testiculares de los murciélagos *C. mexicanus* capturados en julio, fue notorio un nuevo incremento en el diámetro tubular y en el número de células del epitelio

seminífero, así como la aparición de los espermatoцитos; pero hubo una disminución en el índice de apoptosis para el epitelio seminífero con respecto al mes anterior. Como se ha demostrado para otras especies, los espermatoцитos en paquiteno tienen una importante actividad SOD (151), lo que puede generar H_2O_2 y con ello, la posibilidad de lesiones oxidativas del DNA de no existir suficiente actividad de GPX o de CAT. Es conocido también, que en los espermatoцитos en paquiteno se da el entrecruzamiento de los cromosomas y el intercambio de DNA entre las cromátidas (30), proceso que es supervisado por un sistema de monitoreo para reparar los posibles daños al DNA y asegurar la integridad del genoma para la siguiente generación (168). La disminución del índice de apoptosis en el epitelio seminífero del *C. mexicanus* en el mes de julio comparativamente con junio, puede deberse a la colaboración del sistema de monitoreo y reparación de los daños al DNA, junto con la actividad del sistema enzimático antioxidante para disminuir los niveles de EROs.

La disminución de la actividad SOD en agosto es importante puesto que para entonces la espermatogénesis se lleva a cabo de manera completa y la formación de H_2O_2 a altos niveles podría afectar a las espermátidas en sus fases finales de diferenciación, lo que resultaría potencialmente peligroso. Este incremento en la proporción de células germinales que son eliminadas debe estar relacionado con el mantenimiento de una determinada razón numérica entre células de Sertoli:células germinales para que la espermatogénesis proceda adecuadamente. La muerte programada de células germinales se considera esencial en la prevención de formación de tumores (60, 169, 170), y es necesaria para eliminar a las células genéticamente defectuosas (168). De hecho, actualmente se considera a la cinética de la

espermatogénesis como una interacción entre mitosis, meiosis, apoptosis y diferenciación (47, 48).

La estrecha relación entre las actividades de GPX y de GGT con el ciclo de cambios morfológicos del testículo en los murciélagos *C. mexicanus* sugiere una participación conjunta de estas enzimas para atenuar las altas concentraciones de H_2O_2 , manteniendo en funcionamiento el sistema GPX/GR vía la utilización de GSH.

El modelo de investigación de un largo periodo de espermatogénesis en los quirópteros estacionales, como es el caso del *C. mexicanus*, en el que las correspondientes etapas que componen a la espermatogénesis (proliferación de las espermatogonias, meiosis de los espermatocitos y diferenciación de las espermatidas) pueden ser distinguidas con claridad, en diferentes pero secuenciales periodos de tiempo, tiene particular importancia para examinar las variaciones en la concentración de EROs, los diferentes grados de estrés oxidativo resultantes y su efecto sobre cada tipo de células de la estirpe germinal durante el proceso de la espermatogénesis; así como evaluar la posibilidad de renovación en las células somáticas más importantes (células de Leydig y células de Sertoli).

CONCLUSIONES.

Con base en la descripción de la morfología gruesa de los diferentes órganos sexuales masculinos y con la descripción histológica del testículo de varios individuos a lo largo de un ciclo anual completo, se logró la caracterización precisa del patrón reproductivo masculino de la especie *Corynorhinus mexicanus*. Estos murciélagos tienen un solo periodo de actividad reproductiva por año y presentan un desfase temporal en sus funciones sexuales.

En los individuos adultos, los testículos son permanentemente inguinales. Los testículos son los órganos más pesados con respecto a los otros genitales, y presentan marcados cambios entre la condición de receso (noviembre-abril) comparando con la de máximo desarrollo (agosto), cuando presentan un incremento en el peso, de aproximadamente 40 veces. Por lo que el peso correspondiente al par de testículos representa en agosto, en promedio, el 8% del peso corporal total del animal. El reinicio del crecimiento testicular y de la espermatogénesis parece depender de la adquisición de una “condición corporal buena” por parte de los murciélagos. La actividad de espermatogénesis culmina en la segunda mitad de octubre; por lo que el periodo completo de esta función reproductiva principal, abarca un tiempo promedio de 5 meses y medio.

El reinicio del crecimiento en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias (glándulas ampulares y próstata) ocurre en junio y julio respectivamente. Estos órganos se encuentran en una condición de máximo desarrollo en noviembre, y es entonces cuando tienen lugar los apareamientos, empleando para ello, los espermatozoides almacenado en la cauda del

epidídimo desde la segunda mitad de agosto, y sin nuevas aportaciones por parte del testículo. Ambos tipos de órganos, (epidídimo y las glándulas sexuales accesorias) involucionan durante enero-febrero, por lo que los individuos se encuentran en una condición de receso reproductivo en los meses de marzo y abril.

Considerando los criterios morfo-histológicos que han sido utilizados para describir el proceso de la espermatogénesis en los mamíferos, fue posible establecer las etapas que caracterizan la espermatogénesis, y ubicar dichas etapas en sus respectivas fechas a lo largo del ciclo reproductivo del *C. mexicanus* como a continuación se describe:

Reinicio de la espermatogénesis (mayo); por tratarse de una especie estacional, el término reinicio implica individuos sexualmente maduros. Involucra la renovación de las células madre espermatogonias mediante una serie de divisiones mitóticas, para dar paso a la producción de las espermatogonias A y B.

Proliferación de las células germinales (mayo-julio); donde las espermatogonias tipo B presentan varias series de divisiones mitóticas hasta producir espermátocitos primarios, los cuales continúan dividiéndose por meiosis y generar a las espermátidas inmaduras (redondas), estas últimas particularmente a partir de julio.

Espermiogénesis (julio-octubre); las espermatidas inmaduras cursan por una serie de cambios que involucran la diferenciación de estructuras de la cabeza y cola, dando como resultado a los espermatozoides altamente diferenciados.

Espermiación (agosto-octubre); los espermatozoides son liberados del epitelio seminífero hacia el lumen tubular, para ser transportados a la rete testis y posteriormente al epidídimo, donde continuarán su maduración y serán almacenados.

Periodo de inactividad (noviembre-abril); el epitelio seminífero es conformado mayormente por células de Sertoli y por escasas espermatogonias que permanecen como el stock que reiniciará una nueva ronda de espermatogénesis en mayo.

Esta es la primera vez que se genera información para una especie de murciélago estacional, que permite distinguir la dinámica de recambio celular en el testículo, a lo largo del ciclo reproductivo, empleando evidencias directas de eliminación por muerte celular. En ambos compartimientos del testículo, el intersticial y el tubular, el recambio celular se presenta una vez que se ha establecido el periodo de actividad de espermatogénesis. Este recambio fue posible cuantificarlo considerando: el número total de células propias de cada compartimiento testicular, y el porcentaje de células TUNEL(+) como indicador de muerte celular por apoptosis. Durante el reinicio de la actividad espermatogénica, no se presentó eliminación de células germinales, lo que permite la repoblación del epitelio seminífero y el crecimiento del testículo. El mayor índice de apoptosis fue registrado en junio, lo que debe estar relacionado

con el mantenimiento de un adecuado cociente numérico entre las células de Sertoli y las células germinales, necesario para continuar con el buen desarrollo de la espermatogénesis. En general, para los meses de julio a septiembre ocurre eliminación esporádica de células germinales por apoptosis, como parte normal del desarrollo de la espermatogénesis. La involución testicular tiene lugar durante septiembre y octubre.

En el proceso de involución testicular participaron diferentes factores, los cuales fueron distinguidos en dos etapas diferentes; en la primera, que es la fase temprana del periodo de regresión testicular (septiembre), si tuvo participación la muerte de células germinales por apoptosis. Mientras que en la segunda etapa, que corresponde a la fase tardía de la regresión testicular (octubre) no fue detectada apoptosis, por lo que la involución testicular debe ser el resultado de la acción conjunta sustentado por los siguientes factores: el cese de la actividad proliferativa de las células germinales, el transporte de los espermatozoides hacia el epidídimo, el desprendimiento de células germinales inmaduras del epitelio seminífero, el cierre de la luz tubular y la disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos.

El mayor número de células intersticiales (entre estas, las células de Leydig) registrado en los meses de junio y agosto, en los tejidos testiculares del *C. mexicanus*, podría estar en relación con la producción de testosterona en un esquema bimodal, que de corroborarse, sustentaría en una primera instancia, a la espermatogénesis, y en una segunda, a las funciones sexuales secundarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Geiser F., y Ruf T. 1995.** Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: physiological variables and classification of torpor patterns. *Physiol. Zool.* 68: 935-966.
2. **Gustafson A. W. 1979.** Male reproductive patterns in hibernating bats. *J. Reprod. Fertil.* 56: 317-331.
3. **Krutzsch P. H. 2000.** Anatomy, physiology and cyclicity of the male reproductive tract. *En Reproductive biology of bats. Editado por E. G. Crichton y P. H. Krutzsch.* Academic Press, London. pp. 91-155.
4. **Racey P. A., y Entwistle A. C. 2000.** Life history and reproductive strategies of bats. *En Reproductive biology of bats. Editado por E. G. Crichton y P. H. Krutzsch.* Academic Press, London. pp. 363-414.
5. **Speakman J. R., y Racey P. A. 1986.** The influence of body condition on sexual development of male brown long-eared bats (*Plecotus auritus*) in the wild. *J. Zool. London.* 210: 515-525.
6. **Martin L., y Bernard R. T. F. 2000.** Endocrine regulation of reproduction in bats: the role of circulating gonadal hormones. *En Reproductive biology of bats. Editado por E. G. Crichton y P. H. Krutzsch.* Academic Press, London. pp. 27-64.
7. **Jolly S. E., y Blackshaw A. W. 1987.** Prolonged epididymal sperm storage, and the temporal dissociation of testicular and accessory gland activity in the common sheath-tail bat. *J. Reprod. Fertil.* 81: 205-211.
8. **Kurta A., y Kunz T. H. 1988.** Roosting metabolic rate and body temperature of male little brown bats (*Myotis lucifigus*) in summer. *J. Mamm.* 69: 645-651.
9. **Entwistle A. C., Racey P. A., y Speakman J. R. 1998.** The reproductive cycle and determination of sexual maturity in male brown long-eared bats, *Plecotus auritus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *J. Zool. London.* 244: 63-70.
10. **Racey P. A. 1974.** The reproductive cycle in male noctule bats, *Nyctalus noctula*. *J. Reprod. Fertil.* 41: 169-181.
11. **Racey P. A., y Tam W. H. 1974.** Reproduction in male *Pipistrellus pipistrellus* (Mammalia: Chiroptera). *J. Zool. London.* 172: 101-122.

- 12. Tumilson R., 1992.** *Plecotus mexicanus*. Mammalian Species. 401: 1-3.
- 13. López-Wilchis R. 1989.** Biología de *Plecotus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae) en el estado de Tlaxcala, México. Tesis Doctoral UNAM, México. 227 P.
- 14. León-Galván M. A., Fonseca T., López-Wilchis R., y Rosado A., 1999.** Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. Can. J. Zool. 77: 7-12.
- 15. León-Galván M. A., López-Wilchis R., Hernández P. O., Arenas R. E., y Rosado A. 2005.** Male reproductive cycle of the Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). Southwest. Nat. 50: 453-460.
- 16. Pearson P.O., Koford R. M., y Pearson K. A. 1952.** Reproduction of the lump-nosed bat (*Corynorhinus rafinesquei*) in California. J. Mamm. 33: 273-320.
- 17. Stebbings R. E. 1966.** A population study of bats of the genus *Plecotus*. J. Zool. 150: 33-75.
- 18. Lincoln G. A. 1989.** Seasonal aspects of testicular function. *En* The testis. *Editado por* H. Burger y D. de Kretser. 2nd edition, Raven Press, New York. pp. 329-386.
- 19. Bronson F. H., and Heideman P. D. 1994.** Seasonal regulation of reproduction in mammals. *En* The physiology of reproduction. *Editado por* E. Knobil y J. D. Neill. New York: Raven Press, pp. 541-583.
- 20. Neaves W. B. 1973.** Changes in testicular Leydig cells and in plasma testosterone levels among seasonally breeding rock hyrax. Biol. Reprod. 8: 451-466.
- 21. Clay C. M., Squires E. L., Amman R. P., y Pickett B. W. 1987.** Influence of season and artificial photoperiod on stallions: testicular size, seminal characteristics and sexual behavior. J. Anim. Sci. 64: 517-525.
- 22. Sinha-Hikim A. P., Bartke A., y Russell L. D. 1988.** Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. Biol. Reprod. 39: 1225-1237.
- 23. Lincoln G. A. 1992.** Biology of seasonal breeding in deer. *En* The biology of deer. *Editado por* R. D. Brown. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg. pp. 565-574.

- 24. Hombach-Klonisch S., Schön J., Kehlen A., Blottner S., y Klonisch T. 2004.** Seasonal expression of INSL3 and *Lgr8/Insl3* receptor transcripts indicates variable differentiation of Leydig cells in the roe deer testis. *Biol. Reprod.* 71: 1079-10847.
- 25. Hardy M. P., Mendis-Handagama S. M. L. C., Zirkin B. R., y Ewing L. L. 1987.** Photoperiodic variation of Leydig cell numbers in the testis of the golden hamster: a possible mechanism for their renewal during recrudescence. *J. Exp. Zool.* 244: 269-276.
- 26. Johnson L., Matt K. S., Bartke A., Nguyen H. B., y Le H. T. 1987.** Effect of photoperiod on the size of the Leydig cell population and the rate of recruitment of Leydig cells in adult Syrian hamsters. *Biol. Reprod.* 37: 727-738.
- 27. Johnson L., y Tatum M. E. 1989.** Temporal appearance of seasonal changes in numbers of Sertoli cells, Leydig cells, and germ cells in stallions. *Biol. Reprod.* 40: 994-999.
- 28. Hochereau-de Reviere M. T., y Lincoln G. A. 1978.** Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J. Reprod. Fertil.* 54: 209-213.
- 29. Komatsu T., Yamamoto Y., Atoji Y., Tsubota T., y Suzuki Y. 1997.** Seasonal changes in subcellular structures of Leydig and Sertoli cells in the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*. *Arch. Histol. Cytol.* 60: 225-234.
- 30. Sharpe R. M. 1994.** Regulation of spermatogenesis. *En The physiology of reproduction. Editado por E. Knobil, J. D. Neill, L. L. Ewing, G. S. Greenwald, C. L. Markert y D. W. Pfaff.* Raven Press, New York. pp. 1363-1434.
- 31. Muñoz E. M., Fogal T., Dominguez S., Scardapane L., y Piezzi R. S. 2001.** Ultrastructural and morphometric study of the Sertoli cell of the Viscacha (*Lagostomus maximus*) during the annual reproductive cycle. *Anat. Rec.* 262: 176-185.
- 32. Steinberger A., y Steinberger E. 1977.** The Sertoli cells. *En The testis. Editado por A. D. Johnson y W. R. Gomes.* Vol. 4, Academic Press, New York. pp. 371-399.
- 33. Nagy F. 1972.** Cell division kinetics and DNA synthesis in the immature Sertoli cells of the rat testis. *J. Reprod. Fertil.* 28: 389-395.
- 34. De Kretser D. M., y Kerr J. B. 1994.** The cytology of the testis. *En The physiology of*

reproduction. *Editado por* E. Knobil y J. Neil. Vol. 1. Raven Press, New York. pp. 1177-1290.

35. Nandi S., Banerjee P. P., Zirkin B. R., y Glenie L. M. 1999. Germ cell apoptosis in the testes of sprague dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? *Biol. Reprod.* 61: 70-75.

36. Johnson L., Verner D. D., Tatum M. E. y Scrutchfiel W. L. 1991. Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. *Biol. Reprod.* 45: 404-410.

37. Meachem S. J., Stanton P. G., y Schlatt S. 2005. Follicle-stimulating hormone regulates both Sertoli cell and spermatogonial populations in the adult photoinhibited Djungarian hamster's testis. *Biol. Reprod.* 72: 1187-1193.

38. Hochereau-de Reviers M. T., Perreau C., y Lincoln G. A. 1985. Photoperiodic variation of somatic and germ cell populations in the soay ram testis. *J. Reprod. Fertil.* 74: 329-334.

39. Bielli A., Pedrana G., Gastel M. T., Castrillejo A., Morana A., Lundeheim N., Forsberg M., y Rodriguez-Martinez H. 1999. Influence of grazing management on the

seasonal change in testicular morphology in Corridale rams. *Anim. Reprod. Sci.* 56: 93-105.

40. Schlatt S., de Geyter M., Kliesch S., Nieschlag E., y Bergmann M. 1995. Spontaneous recrudescence of spermatogenesis in the photoinhibited male Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Biol. Reprod.* 53: 1169-1177.

41. Milette J. J., Schwartz N. B., y Turek F. W. 1988. The importance of follicle-stimulating hormone in the initiation of testicular growth in photostimulated Djungarian hamsters. *Endocrinology.* 122: 1060-1066.

42. Mruk D. D., y Cheng C. Y. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 25: 747-806.

43. Huckins C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adults rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.* 190: 905.

44. Johnson L., Petty C. S., y Neaves W. B. 1983. Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during

postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol Reprod.* 29: 207-215.

45. Bartke A. 1995. Apoptosis of the male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon. *Endocrinology.* 136: 3-4.

46. Sinha-Hikim A. P., y Swerdloff R. S. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev. Reprod.* 4: 38-47.

47. De Rooij D.J., and Lok D., 1987. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat. Rec.* 217:131.

48. Allan D. J., Harmon B. V., y Roberts S. A., 1992. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif.* 25: 241-250.

49. Kerr J. B. 1992. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J. Reprod. Fertil.* 95: 825-830.

50. Blanco-Rodríguez J. A., y Martínez-García C. 1996. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif.* 29: 13-31.

51. Koji T., y Wang R. A. 1998. Male germ cell death in mouse testes. *En Apoptosis: Its role and mechanism. Editado por* T. Yamada y Y. Hashimoto. Business Center for Academic Societies of Japan, Tokyo. pp. 85-96.

52. Terranova P. F., y Taylor Ch. C. 1999. Apoptosis (cell death). *En Encyclopedia of reproduction. Editado por* E. Knobil y J. D. Neill. Vol. 1, Academic Press, London, UK. pp. 261-273.

53. Adams D. J., y Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 281: 1322-1326.

54. Thornberry N. A., y Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science.* 281: 1312-1316.

55. Wyllie A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284: 555-556.

- 56. Gavrieli Y., Sherman Y., y Ben-Sasson S. A. 1992.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501.
- 57. Kerr J. F. R. 2002.** History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept, *Toxicology.* 181: 471-474.
- 58. Billig H., Furuta I., Rivier C., Tapanainen J., Parvinen M., y Hsueh J. W. A., 1995.** Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology.* 136: 5-12.
- 59. Yokoi H., Yamama Y., Tsuruo Y., Kawarada Y., Miura N., Sugiyama T., y Ishimura K. 1998.** Leydig cells undergoing apoptosis in the perinatal rat testis. *Acta Histochem. Cytochem.* 31: 355-361.
- 60. Rodriguez I., Ody C., Araki K., Garcia I., y Vassalli P. 1997.** An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* 16: 2262-2270.
- 61. Blanco-Rodríguez J. A. 1998.** A matter of death and life: the significant of germ cell death during spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 21: 236-248.
- 62. Brinkworth M. H., Weinbauer G. F., Schlatt S., y Nieschlag E. 1995.** Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 105: 25-33.
- 63. Fujii J., Iuchi Y., Matsuki S., y Ishii T. 2003.** Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J. Androl.* 5: 231-242.
- 64. Miura M., Sasagawa I., Suzuki Y., Nakada T., y Fujii J. 2002.** Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in mouse testis following heat exposure. *Fertil. Steril.* 77: 787-93.
- 65. Ikeda M., Kodama H., Fukuda J., Shimizu Y., Murata M., y Kumagai J. 1999.** Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol. Reprod.* 61: 393-9.
- 66. Sinha-Hikim A. P., Wang C., Leung A., y Swerdloff R. S. 1995.** Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology.* 136: 2770-2775.

- 67. Sinha-Hikim A. P., Rajavashisth T. B., Sinha-Hikim I., Lue Y., Bonavera J. J., Leung A., Wang C., y Swerdloff R. S. 1997.** Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol. Reprod.* 57: 1193-1201.
- 68. Woolveridge I., de Boer-Brower M., Taylor M. F., Teerds K. J., Wu F. C. W., y Morris I. D. 1999.** Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes. *Biol. Reprod.* 60: 461-470.
- 69. Ohta Y., Nishikawa A., Fukuzawa Y., Urushitani H., Matsuzawa A., Nishina Y., y Iguchi T. 1996.** Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta Anat.* 157: 195-204.
- 70. Bargawi A., Trummer H., y Meachem R. 2004.** Effect of prolonged cryptorchidism on germ cell apoptosis and testicular sperm count. *Asian J. Androl.* 6: 47-51.
- 71. Chaki S. P., Misro M. M., Ghosh D., Gautam D. K., y Srinivas M. 2005.** Apoptosis and cell removal in the cryptorchid rat testis. *Apoptosis.* 10: 395-405.
- 72. Ofordeme K. G., Aslan A. R., Nazir T. M., Hayner-Buchan A., y Kogan B. A. 2005.** Apoptosis and proliferation in human undescended testes. *BJU International.* 96: 634-638.
- 73. Bronson F. H. 1989.** Mammalian reproductive biology. The University of Chicago Press, Chicago.
- 74. Blank J. L., y Freeman D. A. 1991.** Differential reproductive response to short photoperiod in deer mice: role of melatonin. *J. Comp. Physiol. [A]* 169: 501-506.
- 75. Heideman P. D. 2000.** Environmental regulation of reproduction. *En Reproductive biology of bats. Editado por E. G. Crichton y P. H. Krutzsch.* Academic Press, London. pp. 469-499.
- 76. Beasley L. J., y Zucker I. 1984.** Photoperiod influences the annual reproductive cycle of the male pallid bat (*Antrozous pallidus*). *J. Reprod. Fertil.* 70: 567-573.
- 77. Furuta I., Porkka T., Scarbrough K., Tapanainen J., Turek F.W., y Hsueh A. J. W. 1994.** Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djugarian hamster. *Biol. Reprod.* 51: 1315-1321.

- 78. Young K. A., Zirkin B. R., y Nelson R. J. 1999.** Short photoperiod induces testicular apoptosis in the white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Endocrinology*. 140: 1331-1339.
- 79. Young K. A., Zirkin B. R., y Nelson R. J. 2000.** Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) is mediated by apoptosis. *Biol. Reprod.* 62: 347-354.
- 80. Bartke A., Goldman B. D., Bex F. J., Kelch R. P., Smith M. S., Dalterio S., y Doherty P. C. 1980.** Effect of prolactin on testicular regression and recrudescence in the golden hamster. *Endocrinology*. 106: 167-172.
- 81. Berkowitz A. S., y Heindel J. J. 1984.** Testicular recrudescence in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): A possible model of sexual maturation. *Endocrinology*. 114: 855-860.
- 82. Mayerhofer A., Sinha Hikim A. P., Bartke A., y Russell L. D. 1989.** Changes in the testicular microvasculature during photoperiod-related seasonal transition from reproductive quiescence to reproductive activity in the adult golden hamster. *Anat. Rec.* 224: 495-507.
- 83. Young K. A., Zirkin B. R., y Nelson R. J. 2001.** Testicular apoptosis is down-regulated during spontaneous recrudescence in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *J. Biol. Rhythms*. 16: 479-488.
- 84. Onyango D. W., Gachoka J. M., Otiang'a-Owiti, G. E., y Hendrickx A. G. 1995.** Seasonally dependent testicular apoptosis in the tropical long-eared bat (*Miniopterus inflatus*). *Z. Säugetierkunde*. 60: 206-214.
- 85. Anthony, E. L. P. 1988.** Age determination in bats. In: H. T. Kunz, editor. *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Smithsonian Institution Press, Washington D. C. Pages 47-58.
- 86. Reynolds A. J. 1999.** Histomorphometry. *En: Light microscopy in biology. A practical approach. Editado por A. J. Lacey.* 2nd Ed. Oxford University Press, Oxford, New York. pp 313-315
- 87. Sgonc R., Boeck G., Dietrich H., Gruber J., Recheis H., y Wick G. 1994.** Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet.* 10: 41-42.
- 88. StataCorp. 2001.** Stata statistical software: Release 7.0. College Station, Texas: Stata Corporation.

- 89. Sokal R. R., y Rohlf F. J. 1995.** Biometry. W. H. Freeman and Co., N.Y.
- 90. Myers P. 1977.** Patterns of reproduction of four species of vespertilionid bats in Paraguay. Univ. Calif. Publ. Zool. 107: 1-41.
- 91. Medway Lord. 1972.** Reproductive cycles of the flat-headed bats *Tylonycteris pachipus* and *T. robustula* (Chiroptera: Vespertilionidae) in a humid equatorial environment. Zool. J. Linn. Soc. 51: 333-361.
- 92. Madhavan A. 1971.** Breeding habits in the Indian vespertilionid bat, *Pipistrellus ceylonicus chrysothrix* (Wroughton). Mammalia. 35: 283-306.
- 93. Swift M. S. 1998.** Long-eared bats. T & AD Poyser Ltd, London, UK. 182 P.
- 94. Jones C., y Suttkus R. D. 1975.** Notes on the natural history of *Plecotus rafinesquii*. Occas. Pap. Mus. Zool. LA. State Univ. 47: 1-14.
- 95. Setchell B. P. 1978.** The mammalian testis. Cornell University Press, London, Elek Books, Ithaca.
- 96. Harcourt A. H., Harvey P. H., Larson S. G., y Short R. V. 1981.** Testis weight, body weight and breeding systems in primates. Nature. 239: 55-57.
- 97. Kenagy G. J., y Trombulak S. C. 1986.** Size and function of mammalian testis in relation to body size. J. Mamm. 67: 1-22.
- 98. Hall J. S. 1963.** Notes on *Plecotus rafinesquii* in central Kentucky. J. Mamm. 44: 119-120.
- 99. McGuckin M. A., y Blackshaw A. W. 1987a.** Seasonal changes in spermatogenesis (including germ cell degeneration) and plasma testosterone concentration in the grey-headed fruit bat, *Pteropus poliocephalus*. Aust. J. Biol. Sci. 40: 211-220.
- 100. Setchell B. P. Maddocks S., y Brooks D. E. 1994.** Anatomy, vaculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. *En* The physiology of reproduction. *Editado por* E. Knobil, J. D. Neill, L. L. Ewing, G. S. Greenwald, C. L. Markert y D. W. Pfaff. Raven Press, New York. pp. 1063-1175.
- 101. Krishna A., y Singh K. 1997.** The relationship between testicular activity, accessory sex glands, and circulating steroid concentration during the reproductive cycle in a male Indian vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. Can. J. Zool. 75: 1042-1050.

- 102. Monesi V. 1972.** Spermatogenesis and the spermatozoa. *En* Reproduction in mammals I: Germ cells and fertilization. *Editado por* C. R. Austin y R. V. Short. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 46-84.
- 103. McGuckin M. A., y Blackshaw A. W. 1987b.** Cycle of the seminiferous epithelium in the grey-headed fruit bat, *Pteropus poliocephalus*. *Aust. J. Biol. Sci.* 40: 203-210.
- 104. Weber J. E., Russell L. D., Wong V., y Peterson R. N. 1983.** Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships. *Am. J. Anat.* 167: 163-79.
- 105. Hess R. A., y Franca L. R. 2005.** Structure of the Sertoli cell. *En* Sertoli cell biology. *Editado por* M. K. Skinner y M. D. Griswold. Elsevier Academic Press, San Diego. pp. 19-40.
- 106. Hinton B. T., y Setchell B. P. 1993.** Fluid secretion and movement. *En* The Sertoli cell. L. D. Russell y M. D. Griswold. Cache River Press, Clearwater, FL, USA. pp. 249-268.
- 107. Bardin C. W., Cheng C. Y., Mustow N. A., y Gunsalus G. L. 1994.** The Sertoli cell. *En* The physiology of reproduction. *Editado por* E. Knobil, J. D. Neill, L. L. Ewing, G. S. Greenwald, C. L. Markert, y D. W. Pfaff Raven Press, New York. pp. 933-974.
- 108. Fisher D. 2002.** New light shed on fluid formation in the seminiferous tubules of the rat. *J. Physiol.* 542: 445-452.
- 109. Lui W. Y., Mruk D., Lee W. M., y Cheng C. Y. 2003.** Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 68: 1087-1097.
- 110. Xia W., Mruk D. D., Lee W. M., y Cheng C. Y. 2005.** Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis -a lesson to learn from the testis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 469-493.
- 111. Sprando R.L., y Russell L. D. 1987.** Comparative study of cytoplasmic elimination in spermatids of selected mammalian species. *Am. J. Anat.* 178: 72-80.
- 112. Kerr J. B., y de Kretser D. M. 1974.** The role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of spermatids. *J. Reprod. Fertil.* 36: 439-440.
- 113. Russell L. D., Bartke A., y Gosh J. C. 1989.** Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen and cytoskeleton of

Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am. J. Anat.* 184: 179-189.

114. Setchell B. P., Pollanen P., y Zupp J. L. 1988. The development of the blood-testis barrier and changes in vascular permeability at puberty in rats. *Int. J. Androl.* 11: 225-233.

115. Wing T. Y., y Christensen A. K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* 165: 13-25.

116. Sharpe R. M. 1989. Possible role of elongated spermatids in control of stage-dependent changes in the diameter of the lumen of the rat seminiferous tubule. *J. Androl.* 10: 304-310.

117. Pelletier R. M. 1988. Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: The mink (*Mustela bison*). *Am. J. Anat.* 183: 68-102.

118. Morales A., y Cavicchia J. C. 1993. Seasonal changes of the blood-testis barrier in viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): A freeze-fracture and lanthanum tracer study. *Anat. Rec.* 236(2): 459-464.

119. Johnson L., y Thompson D. L. Jr. 1986. Seasonal variation in the total volume of

Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. *Biol. Reprod.* 35: 971-979.

120. McLachlan R. I., Wreford N. G., Meachem S. J., de Kretser D. M., y Robertson D. M. 1994. Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. *Biol. Reprod.* 51: 945-955.

121. McLachlan R. I., Wreford N. G., Tsonis C., de Kretser D. M., y Robertson D. M. 1994. Testosterone effects on spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized rat. *Biol. Reprod.* 50: 271-280.

122. McLachlan R. I., O'Donnell L., Meachem S. J., Stanton P. G., de Kretser D. M., Pratis K., y Robertson D. M. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog. Horm. Res.* 57: 149-179.

123. McLachlan R. I., O'Donnell L., Stanton P. G., Balourdos G., Frydenberg M., de Kretser D. M., y Robertson D. M. 2002. Effects of testosterone plus medroxyprogesterone acetate on semen quality, reproductive hormones, and germ cell populations in normal young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 546-556.

- 124. McLachlan R. I., Wreford N. G., O'Donnell L., de Kretser D. M., y Robertson D. M. 1996.** The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J. Endocrinol.* 148: 1-9.
- 125. Grino P. B., Griffin J. E., y Wilson J. D. 1990.** Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology.* 126: 1165-1172.
- 126. Zhou Z. X., Lane M. V., Kemppainen J. A., French F. S., y Wilson E. M. 1995.** Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol. Endocrinol.* 9: 208-217.
- 127. Wright W. W., y Frankel A. I. 1979.** Endogenous androgen concentrations in nuclei isolated from seminiferous tubules of mature rat testes. *J. Steroid Biochem.* 10: 633-640.
- 128. Chen H., Chandrashekar V., y Zirkin B. R. 1994.** Can spermatogenesis be maintained quantitatively in intact adult rats with exogenously administered dihydrotestosterone? *J. Androl.* 15: 132-138.
- 129. Berensztein E. B., Sciara M. I. Rivarola M. A., y Belgorosky A. 2002.** Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: High rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 5113-5118.
- 130. Ghosh S., Bartke A., Grasso P., Reichert L. E. Jr., y Russell L. D. 1992.** Structural response of the hamster Sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. *Anat. Rec.* 234: 513-529.
- 131. Orth J. M., Gunsalus G. L., y Lamperti A. A. 1988.** Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology.* 122: 787-794.
- 132. Johnson L., y Thompson D. L. Jr. 1983.** Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentration of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol. Reprod.* 29: 777-789.
- 133. Johnson L., Zane R. S., Petty Ch. S., y Neaves W. B. 1984.** Quantification of the human Sertoli cell population: Its distribution,

relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol. Reprod.* 31: 785-795.

134. Johnson L. Nguyen H. B. A., Petty Ch. S., y Neaves W. B. 1987. Quantification of human spermatogenesis: germ cell degeneration during spermatocytogenesis and meiosis in testes from younger and older adult men. *Biol. Reprod.* 37: 739-747.

135. Erkkila K. L., Suomalainen M., Wikstro M., Parvinen M., y Dunkel L., 2003. Chemical anoxia delays germ cell apoptosis in the human testis. *Biol. Reprod.* 69: 617-626.

136. Allan D. J., Harmon B. V., y Kerr J. F. R. 1987. Cell death in spermatogenesis. *En Perspectives on mammalian cell death. Editado por C. S. Potten.* Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo. pp. 229-258.

137. Young K. A., y Nelson R. J. 2001. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction.* 122: 677-685.

138. Strbenc M., Fazarinc G., Bavdek S.V., y Pogacnik, A. 2003. Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europaeus* L.) *Anat. Histol. Embryol.* 32: 48-53.

139. Huckins C. 1971. The spermatogonial stem cell population in adult rats I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169: 533-557.

140. Oakberg E. F. 1971. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.* 169: 515-531.

141. Lok D., Weenk D., y de Rooij D. G. 1982. Morphology, proliferation and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the Chinese hamster and the ram. *Anat. Rec.* 203: 83-99.

142. De Rooij D. G. 1998. Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Path.* 79: 67-80.

143. Taboga S. R., de Souza R. S., dos Santos D. C., y Oliani S. M. 1999. Spontaneous germ cell death by apoptosis in epididymis of the adult bat *Artibeus lituratus*. *Cytobios.* 99: 39-45.

144. Kerr J. B. 1999. Temperature effects on testicular function. *En Encyclopedia of reproduction. Editado por E. Knobil y J. D. Neill.* Vol. 4, Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 725-732.

145. Keel B. A., y Abney T. O. 1981. Alterations of testicular function in the

unilateral cryptorchid rat. Proc. Exp. Soc. Biol. Med. 166: 489-495.

146. Sharpe R. M., Kerr J. B., Fraser H. M., y Bartlett J. M. S. 1986. Intratesticular factors and testosterone secretion. J. Androl. 7: 180-189.

147. Tapanainen J. S., Tilly J. L., Vihko K. K., y Hsueh A. J. W. 1993. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropin and androgens as testicular cell survivor factors. Mol. Endocrinol. 7: 643-650.

148. Troiano L., Fustini M. F., Lovato E., Frasoldati A., Malorni W., Capri M., Grassilli E., Marrama P., y Franceschi C. 1994. Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202: 1315-1321.

149. Ahotupa M., y Huhtaniemi I. 1992. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. Biol. Reprod. 46: 1114-1118.

150. Agarwal A., Saleh R. A., y Bedaiwy M. A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil. Steril. 79: 829-843.

151. Bauché F., Fouchard B., y Jégou B. 1994. Antioxidant system in rat testicular cells. FEBS Lett. 349: 392-396.

152. Holland M. K., y Storey B. T. 1981. Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa. Biochem. J. 198: 273-280.

153. Alvarez G. J., y Storey T. B. 1984. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. Biol. Reprod. 30: 323-331.

154. Vernet P., Fulton N., Wallace C., y Aitken, R. J. 2001. Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. Biol. Reprod. 65: 1102-1113.

155. Kumagai A., Kodama H., Kumagai J., Fukuda J., Kawamura K., y Tanikawa H. 2002. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. Mol. Hum. Reprod. 8: 118-23.

156. Kayanoki Y., Fujii J., Islam K. N., Suzuki K., Kawata S., y Matsuzawa Y. 1996. The protective role of glutathione peroxidase in

apoptosis induced by reactive oxygen species. J. Biochem. 119: 817-22.

157. Roveri A., Casasco A., Maiorino M., Dalan P., Calligaro A., y Ursini F. 1992. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. J. Biol. Chem. 267: 6142-6146.

158. Luo L., Chen H., Trush M. A., Show M. D., Anway M. D. y Zirkin B. R. 2006. Aging and the brown Norway rat Leydig cell antioxidant defense system. J. Androl. 27: 240-247.

159. Kukucka M. A. y Misra H. P. 1993. The antioxidant defense system of isolated Guinea pig Leydig cells. Mol. Cell. Biochem. 126: 1-7.

160. Arenas-Ríos E., León-Galván M. A., Mercado P. E., López-Wilchis R., Cervantes D. L. M. I., y Rosado A. 2007. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 148:150-158.

161. Forman E. U., y Skelton D. C. 1990. Protection of alveolar macrophages from

hyperoxia by γ -glutamyl transpeptidase. Am. J. Physiol. 259: L102-L107.

162. Hanigan M. H., y Ricketts W. A. 1993. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. Biochemistry. 32: 6302-6306.

163. Markey C. M., Rudolph D. B., Labus J. C., y Hinton B. T. 1998. Oxidative stress differentially regulates the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs in the initial segment of the rat epididymis. J. Androl. 19: 92-99.

164. Burdon R. H., y Rice-Evans C. 1989. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. Free Radic. Res. Commun. 6: 345-358.

165. Nakamura H., Nakamura K., y Yodoi J. 1997. Redox regulation of cellular activation. Annu. Rev. Immunol. 15: 351-369.

166. Wang H. P., Schafer F. Q., Goswami P. C., Oberley L. W., y Buettner G. R. 2003. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induces a delay in G1 of the cell cycle. Free Radic. Res. 37: 621-630.

167. Yang J. Q., Buettner G. R., Domann F. E., Li Q., Engelhardt J. F., Weydert C. D., y

Oberley L. W. 2002. v-Ha-ras mitogenic signaling through superoxide and derived reactive oxygen species. *Mol. Carcinog.* 33: 206-218.

168. Yamada Y., y Coffman C. R. 2005. DNA damage-induced programmed cell death potential roles in germ cell development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1049: 9-16.

169. Furuchi T., Masuko K., Nishimune Y., Obinata M., y Matsui Y. 1996. Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development.* 122: 1703-1709.

170. Schneider, D. T., Schuster A. E., Fritsch M. K., Hu J., Olson T., Lauer S., Göbel U., y Perlman E. J. 2001. Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res.* 61: 7268-7276.

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

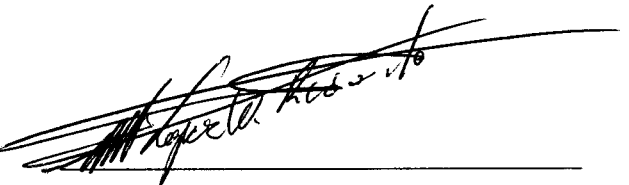
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en B. R. A. MIGUEL ANGEL LEÓN GALVÁN

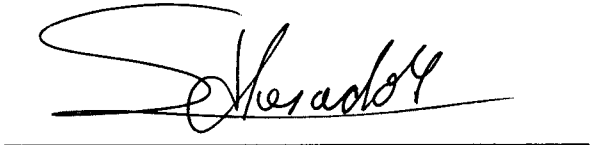
El día 13 de octubre de 2008

Miembros del jurado:

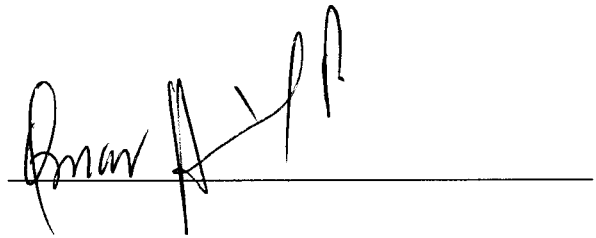
Director: Dr. Ricardo López Wilchis



Asesor: Dr. Adolfo Rosado García



Asesor: Dr. Omar Hernández Pérez



Sinodal: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor



Sinodal: Dr. José Miguel Betancourt Rule

