



DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRIA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**DETERMINACIÓN DE MARCADORES SEROTONINÉRGICOS EN EL
TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO DEL MURCIÉLAGO *MYOTIS VELIFER*
DURANTE SU CICLO REPRODUCTIVO.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

BIOLOGO LUIS ANTONIO MARTÍNEZ MÉNDEZ

COMITÉ TUTORAL:

CODIRECTOR DR. FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ TREJO

CODIRECTOR DR. RICARDO LÓPEZ WILCHIS

ASESOR DR. MIGUEL ÁNGEL LEÓN GALVÁN

México D.F. a 22 de Mayo del 2014.

DR. FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ TREJO
Departamento de biología, Facultad de Química C.U., UNAM
Sistema Nacional de Investigación I
trejofj@hotmail.com

DR. RICARDO LÓPEZ WILCHIS
Departamento de Biología, UAM – Iztapalapa
Sistema Nacional de Investigación I
rlw@xanum.uam.mx

DR. MIGUEL ÁNGEL LEÓN GALVÁN
Departamento de Biología, UAM – Iztapalapa
Sistema Nacional de Investigación I
león@xanum.uam.mx

“La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana conto con apoyo para becas de estudiante en Base al Acuerdo 02/2011 del Rector General”.

“La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con apoyo de becas para estudiantes del mismo Consejo, con número de referencia 003797.”

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa abajo firmantes aprobaron la tesis:
**DETERMINACIÓN DE MARCADORES SEROTONINÉRGICOS EN EL TESTÍCULO
Y EPIDÍDIMO DEL MURCIÉLAGO *MYOTIS VELIFER* DURANTE SU CICLO
REPRODUCTIVO.**

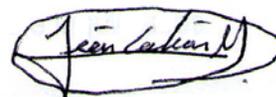
El día 22 de Mayo del año de 2014.

Miembros del Jurado

Presidente: Dra. Edith Arenas Ríos _____



Secretario: Dr. Miguel Angel León Galván _____



Vocal: Dra. Marcela Arteaga Silva _____



Vocal: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes _____

PA


DEDICATORIA

A mis padres: Juan Martínez Rosano y Paulina Méndez Elizalde, por sus enseñanzas y amor otorgados durante mi vida.

A mi esposa Jany Mariela Corona Leo, quien desde antes me a poyado incondicionalmente, pero en especial por su amor durante este tiempo y darme la dicha de tener una nueva faceta en mi vida y vivir nuevas experiencias con la llegada de Isaí.

A Isaí por enseñarme nuevas cosas cada día; con todo mi amor y cariño.

A mis hermanos; Juan Saul, Paulina Soledad y Laura Gabriela Martínez Méndez y cuñada Martha Adriana Ayala Bocanegra, por su gran apoyo y cariño.

A mis sobrinos: Iván Hernández López, Adriana y Juan Carlos Martínez Ayala y Brenda Martínez Méndez, por compartir con migo sus alegrías e inquietudes.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apreciable apoyo y comprensión.

A la Universidad Autónoma Metropolitana.

Al Dr. Ricardo López Wilchis, por ofrecerme su apoyo y enseñanzas de una manera incondicional. Al Dr. Miguel Ángel León Galván, por sus enseñanzas y consejos tanto en el trabajo de campo como el de laboratorio. Al Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo, por su orientación y enseñanzas en el trabajo de laboratorio. A la M en C. María Asunción Soto Alvares, por facilitarnos su equipo y laboratorio para la cuantificación de testosterona.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y a la Dra. Adriana Mendoza por facilitarnos el laboratorio F-206 en la facultad de química, Ciudad Universitaria, para la realización de este trabajo. Al M en C. Ricardo Vázquez, por su orientación en la técnica de Western Blot.

A mis compañeros de Maestría en Biología de la Reproducción Animal, por sus consejos y amistad brindados durante este tiempo.

Al financiamiento parcial de los proyectos divisionales de la UAMI: Biología y ecología de mamíferos de México bajo responsabilidad de Dr. Ricardo López Wilchis y al de Biología de la reproducción en vertebrados silvestres de México bajo responsabilidad de Dr. Miguel Ángel León Galván; y al patrocinio otorgado por CONACYT con proyecto número 80338 y al PAPIIT de la UNAM con números: IN219710 - 2, IN210412.

INDICE

1. LISTADO Y PIES DE FIGURAS.....	A
2. RESUMEN.....	1
3. ABSTRACT.....	2
4. INTRODUCCIÓN.....	3
4.1 Patrones Reproductivos en Murciélagos.....	4
4.2 Datos Generales del Murciélago <i>Myotis velifer</i> (J. A. Allen, 1890).....	7
4.2.1 Clasificación científica.....	7
4.2.2 Características generales.....	7
4.3 Generalidades de la Serotonina.....	10
4.4 La Serotonina en la Fisiología Reproductiva Masculina.....	13
4.5 La Serotonina en Murciélagos.....	15
5. JUSTIFICACIÓN.....	16
6. HIPOTESIS.....	17
7. OBJETIVO GENERAL.....	18
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	18

9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
9.1 Trabajo de Campo.....	19
9.2 Trabajo de Laboratorio	23
9.2.1 Histoquímica por el método de Falck Hillarp para detección de 5-HT.....	23
9.2.2 Inmunofluorescencia para localizar 5-HT en testículos.....	25
9.2.3 Inmunotransferencia por Western Blot para detectar las proteínas de TPH y MAO _A	26
9.2.4 Cuantificación de 5-HT por ELISA.....	28
10. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.....	29
11. RESULTADOS.....	30
11.1 Patrón reproductivo masculino asincrónico del murciélago <i>Myotis velifer</i> en el centro de México.....	30
11.2 Detección y localización de 5-HT en el testículo del murciélago <i>Myotis velifer</i>	33
11.2.1 Detección de 5-HT por el método histoquímico de Falck Hillarp.....	33
11.2.2 Detección de 5-HT por el método de inmunofluorescencia...	35

11.3 Detección de las enzimas de TPH y MAO _A por Western Blot en testículo y epidídimo del murciélago <i>Myotis velifer</i>	37
11.4 Concentración de 5-HT en plasma sanguíneo, y en tejidos testicular y epididimario en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago <i>Myotis velifer</i>	39
12. DISCUSIÓN.....	42
13. CONCLUSIONES.....	48
14. LITERATURA CITADA.....	49
15. ANEXO I.....	i
16. ANEXO II.....	iii
17. ANEXO III.....	ix
18. ARTICULO PUBLICADO.....	x

LISTADO Y PIES DE FIGURAS

- Figura 1. Diferentes patrones reproductivos de murciélagos durante su ciclo anual, A) ovulación/fertilización postergada; B) implantación postergada. RT = regresión testicular (Modificado de Kawamoto, 2003)..... 6
- Figura 2. A y A' Fotografías representativas de murciélagos *Myotis velifer*, B y B' se muestran fotografías de murciélagos con escarcha en su cuerpo durante el periodo de hibernación..... 8
- Figura 3. Esquema que muestra la ruta metabólica de la serotonina. (Modificado de Fidalgo et al., 2012)..... 11
- Figura 4. Esquema representativo de la cascadas de señalización de los receptores de 5-HT acoplados a proteínas G. (Modificado de Berumen *et al.*, 2012)..... 12
- Figura 5. Esquema que muestra las 3 localidades de captura de los murciélagos *Myotis velifer* para éste estudio en los estados de Puebla y Tlaxcala de la República Mexicana 19
- Figura 6. Fotografías de las localidades de captura de *Myotis velifer* en los estados de Puebla y Tlaxcala. A) Hacienda la Almeya en el municipio de Aquixtla; B) Cueva Chicomostoc en los alrededores de Nauzontla; C) El Túnel del lado seco y C') lado húmedo, en la sierra de Tlaxco, Tlaxcala-Puebla..... 21
- Figura 7. Imagen en la que se muestran las diferentes redes de captura utilizadas para este estudio. A) Red de golpe, B) Red de niebla, C) Red de arpa y C') Murciélagos capturados con la red de arpa..... 22
- Figura 8. Esquema que muestra los diferentes eventos reproductivos del murciélago *Myotis velifer*, adaptado a la región central de México, basado en Racey (1974), Kruttsch, (2009), además de datos de campo obtenidos por nuestro grupo de investigación desde los años 80's (Arratia, 2000; López-Wlichis, y León-Galván datos no publicados)..... 31

Figura 9. Variación promedio mensual \pm desviación estándar en el tamaño de los órganos sexuales masculinos de individuos adultos, sexualmente maduros del murciélago *Myotis velifer* a lo largo de un ciclo anual. A) Diámetro mayor (—) y diámetro menor (— —) de los testículos; B) Longitud del epidídimo (—). El valor en paréntesis indica el número de órganos que fueron medidos por mes, ANDEVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey, * $p < 0.05$ entre meses de estudio..... 32

Figura 10. Microfotografías representativas de cortes del cerebro (utilizado como control) y testículos de murciélagos adultos de *Myotis velifer*. A) Cerebro, control positivo, el recuadro inserto es el control negativo; B) testículo en etapa de inactividad reproductiva (Marzo); C) testículo en etapa de espermatogénesis (Julio), y D) testículo en inactividad de espermatogénesis (Noviembre). Las flechas muestran vesículas positivas a 5-HT, y los asteriscos ubican la luz de los túbulos seminíferos. Magnificación: 40 X..... 34

Figura 11. Microfotografías de secciones histológicas del testículo de murciélagos *M. velifer* en sus diferentes etapas del ciclo de reproducción anual, donde se aprecia la detección de serotonina por inmunofluorescencia. A) Testículo en etapa de inactividad reproductiva (Marzo), en el recuadro se observan neuronas 5-HT positivas localizadas en el tallo cerebral (control positivo). B) Testículo en etapa de espermatogénesis (Julio). C) Testículo en etapa de involución (Noviembre). D) Cerebro usado como control negativo. En A', B' C' y D' se presentan fotografías con el uso de sondas específicas para núcleos (Hoechst) en color azul, correspondientes al mismo campo de observación del tejido con marcaje positivo para serotonina en color rojo de las figuras A, B, C y D. Las flechas muestran la localización exacta de las vesículas positivas a 5-HT; mientras que la punta de flecha en D, señala la posición de una célula sin marca positivas a 5-HT). El asterisco indica la ubicación del lumen del túbulo seminífero. Magnificación: 40 X..... 36

Figura 12. Bandas de proteínas correspondientes a las enzimas TPH y MAOA en A y B respectivamente de los Western Blot de testículos y epidídimos del Murciélago *Myotis velifer*. C) control de proteínas β -actina. D y E análisis densitométrico de la expresión de proteínas de las enzimas TPH y MAOA respectivamente. EM = epidídimo de marzo; EJ = epidídimo de julio; EN = epidídimo de noviembre; TM = testículo de marzo; TJ = testículo de julio y TN = testículo de noviembre. . Las barras representan el valor promedio de órganos analizados \pm desviación estándar. En el paréntesis se indica la cantidad de testículos o epidídimos utilizados por mes para este estudio. ANDEVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey, $*p < 0.05$ entre las etapas del ciclo reproductivo 38

Figura 13. Comparación de los valores promedio de concentración de 5-HT en plasma sanguíneo en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Myotis velifer*. Las barras representan el valor promedio de murciélagos analizados \pm desviación estándar. En el paréntesis se indica la cantidad de murciélagos utilizados por mes para este estudio. El análisis estadístico no demuestra la existencia de diferencias significativas entre los valores de las diferentes etapas analizadas (F= 1.323, ANDEVA, $p < 0.05$) 40

Figura 14. Comparación del valor promedio de la concentración de 5-HT obtenida para los órganos sexuales en diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Myotis velifer*. A) Testículo; B) Epidídimo. Las barras representan el valor promedio de los órganos analizados \pm desviación estándar. En el paréntesis se indica la cantidad de testículos o epidídimos utilizados por mes para este estudio; ANDEVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey $*p < 0.05$ para las diferentes etapas del ciclo reproductivo (Marzo: inactividad reproductiva completa; Julio: espermatogénesis; Noviembre: inactividad de espermatogénesis, almacenamiento epididimario de esperma y apareamiento)..... 40

Figura 15. Comparación de los valores promedio de la concentración de testosterona en tejido testicular en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Myotis velifer* (resultados preliminares). Las barras representan el valor promedio de testículos analizados \pm desviación estándar. En el paréntesis se indica la cantidad de testículos utilizados por mes para este estudio; ANDEVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey * $p < 0.05$ entre etapas del ciclo de reproducción..... 41

RESUMEN

El mecanismo de reproducción en los mamíferos es muy complejo y en algunos casos es bastante particular. Por ejemplo, en algunas especies de murciélagos, el macho presenta un mecanismo de reproducción caracterizado por un ciclo testicular anual que va desde el recrudecimiento a la regresión (de espermatogénesis al período de inactividad, respectivamente). Después de la recrudescencia testicular, los espermatozoides llegan al epidídimo y son almacenados en la región caudal hasta ser expulsados al momento de la eyaculación durante el período de apareamiento, que se produce unos meses después. Debido a que la serotonina (5-HT) en los últimos años ha ganado importancia e interés en los mecanismos de la reproducción masculina, el objetivo del presente estudio fue analizar la expresión de esta indolamina y de triptófano hidroxilasa y monoamina oxidasa isoforma A - enzimas implicadas en su metabolismo en los testículos y epidídimos de *Myotis velifer* -, una especie de murciélago con reproducción estacional que muestra asincronía temporal entre sus funciones reproductivas primarias y secundarias en los machos. Mediante el uso de técnicas como el método de histoquímica de Falck – Hillarp, técnicas de inmunofluorescencia, Western Blot y por Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas , localizamos vesículas de serotonina en las células de Leydig y probablemente en células de Sertoli dentro de los túbulos seminíferos; interesantemente, tanto la localización intracelular y la concentración fue variable a través de las diferentes etapas del ciclo reproductivo, siendo menor durante la fase de la espermatogénesis y mostrando un aumento durante la etapa de maduración-almacenamiento espermático en el epidídimo. Nuestros resultados dirigen a una relación inversamente proporcional entre la síntesis y concentración de serotonina con respecto a la testosterona ambas producidas en los testículos. Estos resultados sugieren que la 5-HT puede funcionar como un reloj biológico que pudiera modular la función testicular de los murciélagos estacionales durante su ciclo reproductivo.

ABSTRACT

The mechanism of reproduction in mammals is very complex and in some cases is quite particular. For example in some bat species, the male presents a reproductive mechanism characterized by an annual testicular cycle that goes from recrudescence to regression (spermatogenesis to inactivity period, respectively). After recrudescence, the spermatozoa arrive at epididymis and wait to be expelled at the time of ejaculation during the mating period, which occurs some months later. Because serotonin (5-HT) has gained reproductive importance in the last years, the aim of the present study was to analyze the expression of this indolamine and both tryptophan hydroxylase and monoamine oxidase isoform A - enzymes involved in its metabolism- in *Myotis velifer* testes and epididymis, a seasonal reproductive bat species that shows temporal asynchrony in its sexual cycle, across the principal periods of their reproductive cycle. By using both Falck–Hillarp histochemistry, immunofluorescence techniques, western blot and by ELISA we found serotonin in vesicles of Leydig cells and probably Sertoli cells too; interestingly, both intracellular localization and concentration was variable across the different stages of the reproductive cycle, being lower during spermatogenesis phase and increasing during the storage and maturation, sperm in the epididymis. These results suggest that 5-HT is present in bat testes and epididymis and it could play an important role in testicular function during their reproductive cycle.

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos se presentan dos principales patrones reproductivos dependiendo de sus adaptaciones a las condiciones climáticas. Especies con reproducción de tipo continua y especies estacionales, Las especies de reproducción continua, se pueden reproducir a lo largo de todo el año y las especies con patrones estacionales dependerán de los factores ambientales (i.e. disponibilidad de alimento y de luz-oscuridad), mismas que modulan sus conductas reproductivas para llevar a cabo la cópula.

Dentro de las especies con reproducción continua existen diversos patrones fisiológicos que determinan el momento adecuado para el apareamiento como: el ciclo estral de las hembras y la liberación de feromonas para que se logre la activación de la conducta típica de los machos, lo que permite incrementar características como agresividad y competencia por las hembras para su resguardo y aseguramiento de las siguientes generaciones.

Por otro lado, en especies con reproducción estacional, se manifiestan patrones conductuales en las primeras etapas de inicio de su ciclo reproductivo caracterizadas por la formación de parejas, el cortejo, la monta y el apareamiento. En las hembras con reproducción estacional las condiciones del hábitat influirán junto con las horas luz del día en la presentación del ciclo estral, mientras que en los machos se inicia el crecimiento testicular o también llamada recrudescencia testicular, como ocurre en especies como el carnero (Sanford y Baker, 2010) y el hámster (Frungieri, *et al.*, 1996; 1999), mientras que en la época de inactividad sexual o también conocida como involución o regresión testicular se presenta una disminución extremadamente marcada de este órgano y rara vez se presenta la libido a excepción de especies con apareamientos desfasados al periodo de espermatogénesis (Morgan y Mercer, 1994; León-Galván, 2005; Young y Nelson 2001).

Interesantemente, en algunas especies con estacionalidad reproductiva los machos adultos muestran una asincronía temporal en el desarrollo y función de sus órganos reproductivos, mostrando un ciclo testicular anual y de las glándulas sexuales accesorias León-Galván *et al.*, 2005; Krutzsch, 2009; Jiménez-Trejo *et al.*, 2013 y probablemente epididimal (ideas por demostrar).

Patrones Reproductivos en Murciélagos.

Las especies de mamíferos que presentan un patrón reproductivo continuo producen en cualquier época del año una o varias crías a lo largo de este, presentándose en lugares donde las condiciones ambientales a lo largo del año no muestran variaciones estacionales significativas como las zonas tropicales (Bronson, 1989); mientras que un gran número de especies de zonas templadas presentan un patrón reproductivo estacional como estrategia para poder afrontar las condiciones climáticas a lo largo del año (principalmente en los cambios de estaciones entre invierno y primavera), en la que se tienen fluctuaciones en la disponibilidad de alimento, por lo que las crías nacen regularmente durante la primavera que es cuando se tiene la mayor disponibilidad de alimento y se garantiza la supervivencia de las crías, al controlar su fenología reproductiva (gestación, partos y lactancia; Malpoux, 2006).

Con respecto a los murciélagos existen ambos tipos de conductas sexuales por lo que un porcentaje de ellos muestran características de reproducción continuas y otro porcentaje muestra patrones de apareamiento estacional (Crichton y Krutzsch 2000).

En estas últimas especies de murciélagos se presentan modificaciones reproductivas con una falta de sincronía en los órganos primarios y glándulas accesorias de los machos, observándose una estrecha relación de factores como la hibernación en la época de fríos, el periodo de lluvias en la época de verano, la altitud en los sistemas montañosos y la latitud con respecto hacia el norte o sur de los continentes (Wimsatt, 1960; Kunz, 1982; Crichton y Krutzsch 2000).

A diferencia de los demás mamíferos que hibernan, algunos murciélagos presentan una inusual característica reproductiva en la cual su periodo reproductivo se divide en dos patrones generales que se basan en el tiempo y duración de los principales eventos del ciclo anual reproductivo como resultado de las adaptaciones fisiológicas a un intervalo prolongado de la hibernación, mismos que correlacionan con patrones de ovulación y/o fertilización postergada y el de implantación postergada del embrión (figura 1; Gustafson, 1979; Kawamoto, 2003), en otras palabras son capaces de manipular el tiempo de apareamientos y el nacimiento de sus crías, para que este acontezca durante el período de tiempo cuando los factores ambientales son los mejores.

Algunos murciélagos estacionales como los vespertiliónidos y rinolofidos hibernantes presentan una marcada separación temporal de sus actividades cotidianas y sus funciones reproductivas; en los machos la función reproductiva primaria, inicia en los testículos con el proceso de espermatogénesis (recrudescencia) y este ocurre durante el verano y el principio del otoño exclusivamente; y la actividad y función reproductiva secundaria ocurren durante la época de otoño donde se observa una máxima actividad de las glándulas sexuales accesorias junto con el almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo, el aumento de la libido y el inicio de las cópulas (Gustafson, 1979).

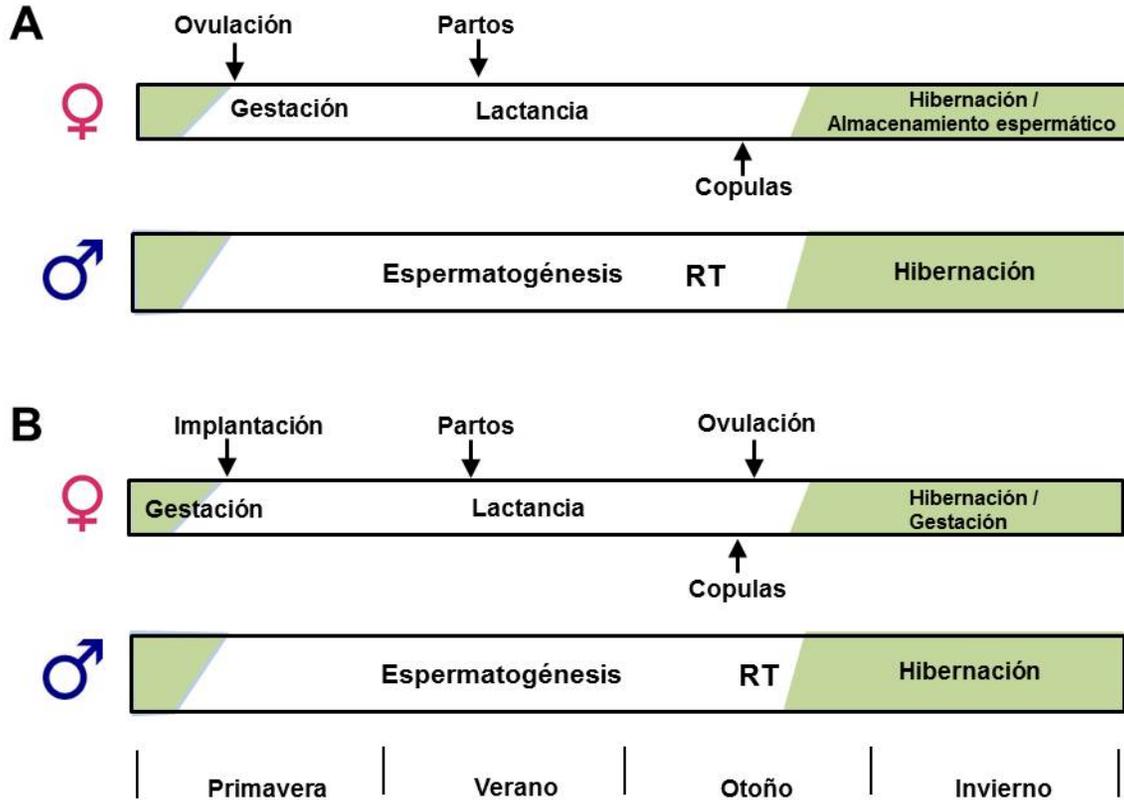


Figura 1. Diferentes patrones reproductivos de murciélagos durante su ciclo anual, **A)** ovulación/fertilización postergada; **B)** implantación postergada. RT = regresión testicular. (Modificado de Kawamoto, 2003).

Específicamente en los murciélagos estacionales, los machos presentan dos categorías:

- 1) Una bimodal en la que se da una recrudescencia e involución testicular en relación con la presentación de estros (poliéstricas) por parte de las hembras a lo largo del año.
- 2) Una en las que se tienen a las especies con una sola actividad testicular anual coincidiendo con el patrón monoéstrico de las hembras (León-Galván, 2008).

Datos Generales del Murciélago *Myotis velifer* (J. A. Allen, 1890)

Clasificación científica

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Mammalia

Infraclase: Eutheria

Superorden: Laurasiatheria

Orden: Chiroptera

Familia: Vespertilionidae

Género: *Myotis*

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

Características generales

El microquiróptero *Myotis velifer* perteneciente a la familia vespertilionidae (figura 2), es un pequeño murciélago insectívoro, con una masa corporal de entre 7.5 – 10.0 g, hibernante, presentando una amplia distribución desde Estados Unidos (Texas, Kansas, Oklahoma, Nevada, Nuevo México, Arizona, California), oeste, centro y sureste de México, llegando hasta Honduras (Fitch *et al.*, 1981; Krutzsch, 2009).

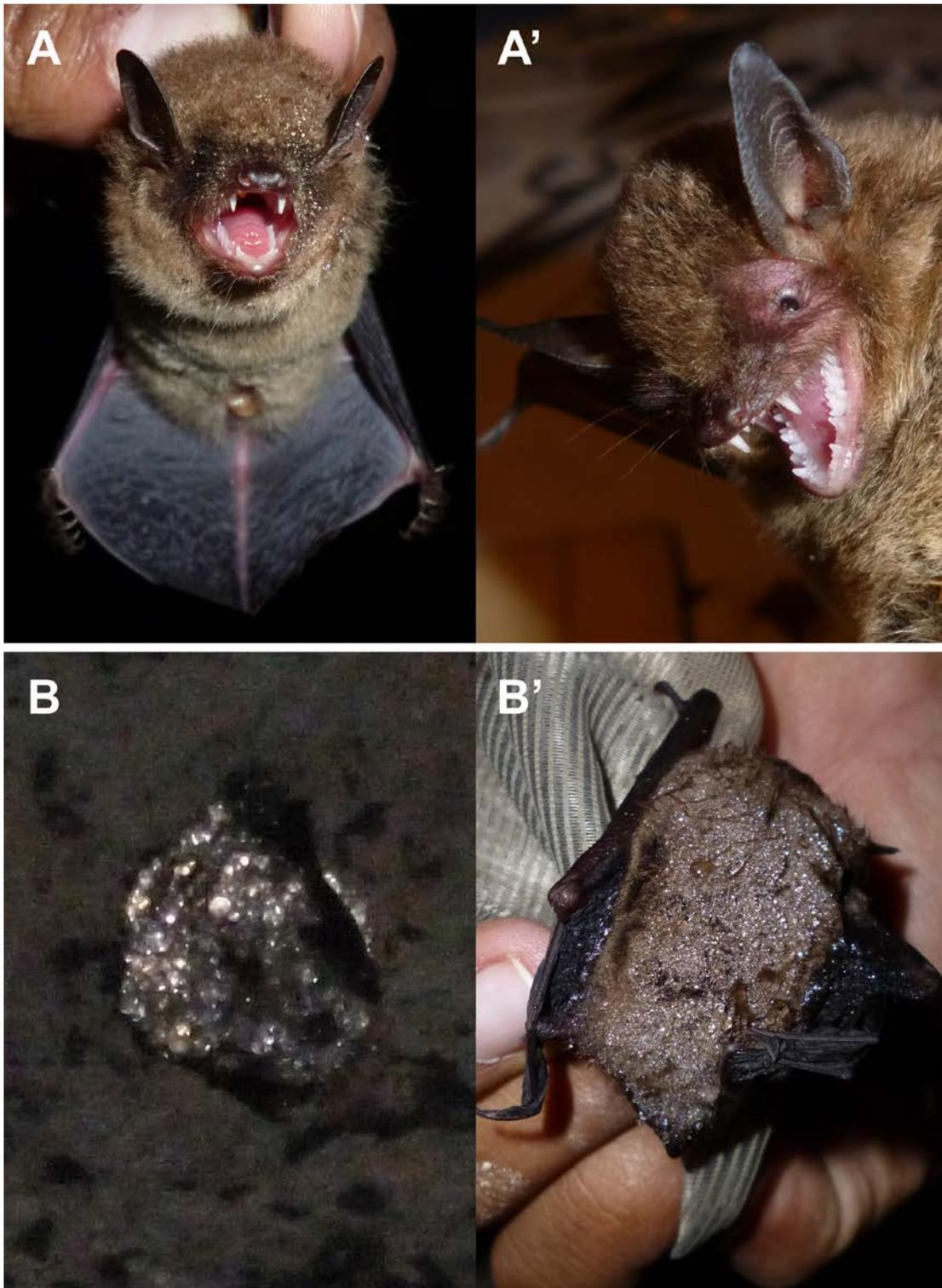


Figura 2. A y A' Fotografías representativas de murciélagos *Myotis velifer*, B y B' se muestran fotografías de murciélagos con escarcha en su cuerpo durante el periodo de hibernación.

Como anteriormente se menciona, *Myotis velifer* es una especie monoéstrica, con una cría por embarazo (monotoca), con un patrón reproductivo asincrónico por parte del macho, en el que los cambios estacionales se manifiestan en el tamaño del testículo y el epidídimo de los adultos; el incremento testicular empieza en mayo y el máximo tamaño se alcanza en septiembre (Krutzsch, 2009). Observaciones realizadas en ejemplares de Arizona y de Texas (Hayward, 1970; Fitch *et al.*, 1981; Krutzsch, 2009), indican que este crecimiento testicular corresponde al periodo de espermatogénesis reportado para otros vespertiliónidos (Wimsatt, 1960; 1969). Al principio del otoño en *M. velifer* los testículos presentan una disminución en tamaño y el epidídimo tiende a aumentar su tamaño por la llegada de espermatozoides. El máximo engrosamiento de la cauda epididimal ocurre en octubre y la reducción en su tamaño durante el invierno (Kunz, 1973; Krutzsch, 2009).

En poblaciones del centro de México, Arratia (2000) y Jiménez-Trejo *et al.*, (2013), encontraron que el ciclo reproductivo de *M. velifer* es muy semejante al que presentan los vespertiliónidos de zonas templadas, con un patrón morfológico asincrónico, ajustándose plenamente al modelo reproductivo tipo *Myotis* según Gustafson (1979). Al parecer, esta semejanza varía por unos 30 a 45 días de diferencia entre especies de *Myotis* descritas por Gustafson y nuestro grupo de estudio desde los últimos años del siglo pasado (López- Wilchis, y León-Galván, datos no publicados).

Generalidades de la Serotonina.

La Serotonina o 5-Hidroxitriptamina (C₁₀H₁₂N₂O; 5-HT) es conocida principalmente como una monoamina neurotransmisora, que se ha conservado filogenéticamente en una amplia gama de especies animales desde nematodos hasta humanos (Marston *et al.*, 2011).

La 5-HT principalmente descritas en roedores como la rata se sintetiza ampliamente en el sistema nervioso central (SNC) y también puede ser encontrado en células de la mucosa gastrointestinal (células enterocromafines), donde se tiene el mayor porcentaje de su producción (95%) con respecto al cuerpo y en plaquetas de la sangre (Peroutka y Howell 1994; Kawai y Rosen, 2010; Gershon, 2004); La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido L-triptófano (L-Trp), por la enzima triptófano 5-hidroxilasa (TPH) (Vanhoutte, 1985; Gaspar *et al.*, 2003); presentándose en dos isoformas, una en el SNC principalmente en las neuronas centrales del tallo cerebral (TPH2) y en células neuroendocrinas del sistema gastroentérico (TPH1); su principal vía catabólica es la desaminación oxidativa por la monoamina oxidasa tipo A (MAO_A), de donde se genera como producto final al ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA; Berumen *et al.*, 2012; Fidalgo *et al.*, 2012). La 5-HT puede ser metabolizada inmediatamente a melatonina por la enzima Arilalquilamina N- acetiltransferasa (Siegel *et al.*, 2011; figura 3). La melatonina es una neurohormona que participa directamente en los ciclos de luz-oscuridad.

La 5-HT periférica se ha implicado en la agregación plaquetaria, tono vascular, hipertensión y la motilidad intestinal (Marston *et al.*, 2011); a nivel de SNC sea asociado con la regulación de la temperatura, los ritmos circadianos, agresión y el balance energético (Fidalgo *et al.*, 2012).

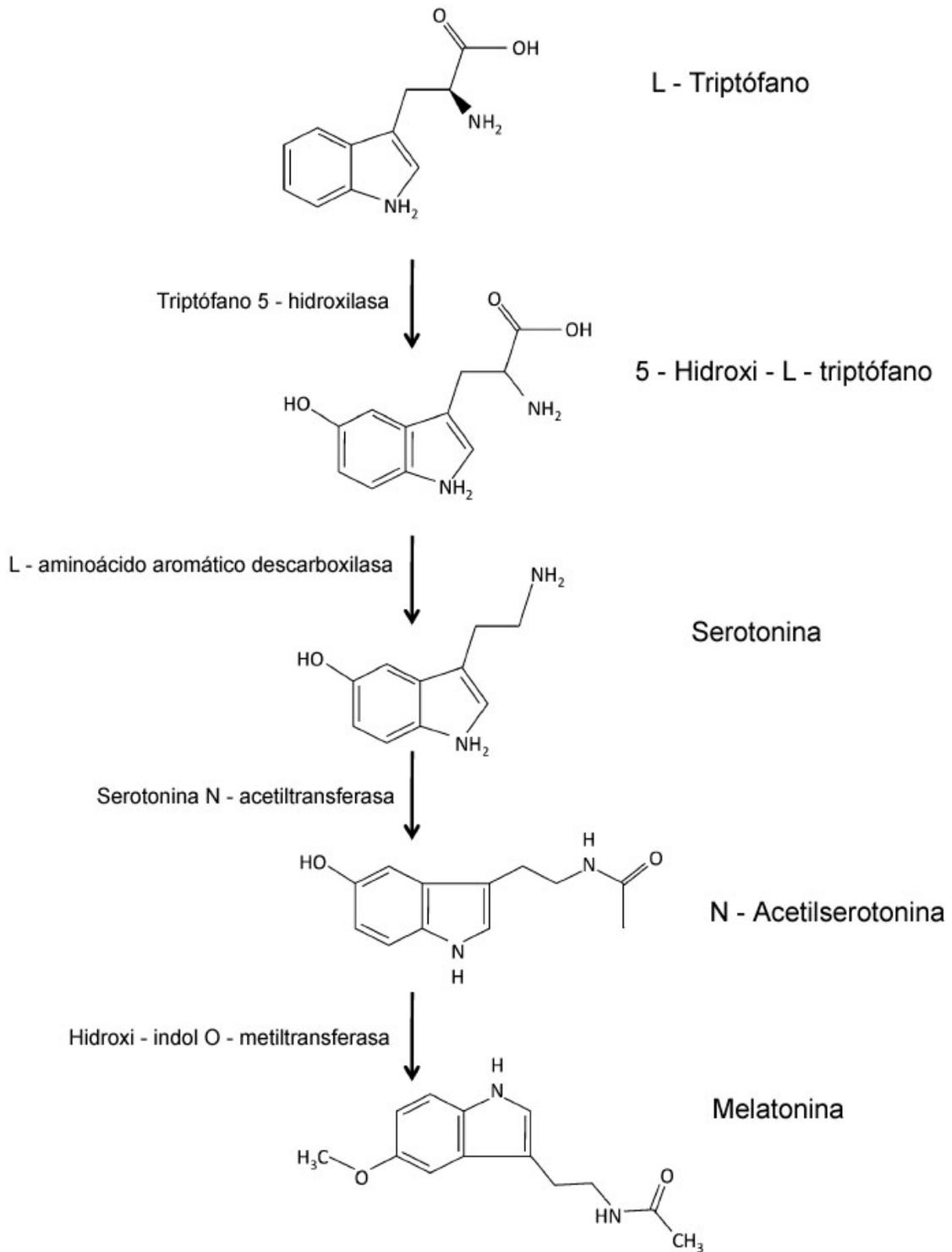


Figura 3. Esquema que muestra la ruta metabólica de la serotonina. (Modificado de Fidalgo *et al.*, 2012)

La 5-HT es una molécula que funciona eficientemente a pH básico y que dentro de las células es transportada en vesículas por medio de un transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Existen dos isoformas: el VMAT1 que se presenta únicamente en células neuroendocrinas y se localiza en tejidos periféricos y la isoforma central y/o neuronal: VMAT2 (Erickson *et al.*, 1996). La 5-HT es liberada de las vesículas por exocitosis en las hendiduras sinápticas donde se une a sus receptores pre-sinápticos y/o pos-sinápticos que se clasifican en 7 diferentes familias (5-HT₁ – 5-HT₇; Filip y Bader 2009). Los receptores 5-HT₁ están acoplados a la proteína Gi, que inhibe a la adenilato ciclasa y esta al segundo mensajero, los receptores 5-HT₂ estimulan la fosfolipasa C (proteínas Gq) y los receptores 5-HT₄₋₇ están acoplados a proteínas Gs estimulando la adenilato ciclasa (figura 4; Hoyer *et al.*, 2002). El receptor de 5-HT₃ es un canal de iones dependientes de ligando y es independiente de la adenilato ciclasa (Costall y Naylor, 2004).

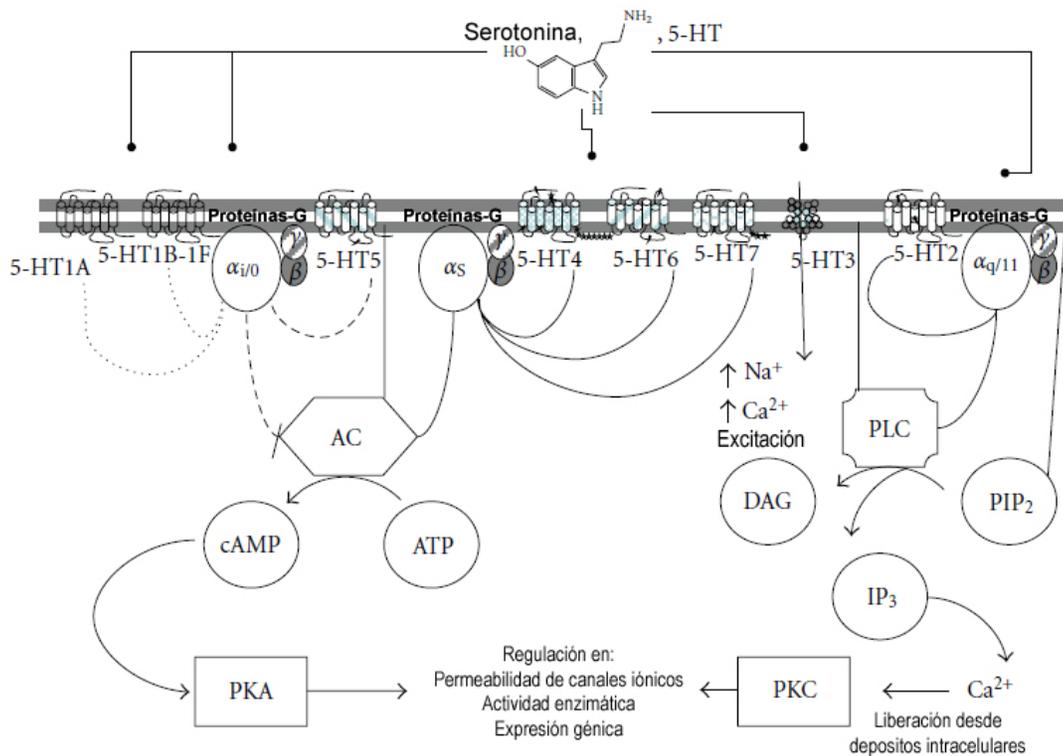


Figura 4. Esquema representativo de la cascada de señalización de receptores de 5-HT acoplados a proteínas G. (Modificado de Berumen *et al.*, 2012).

La re-captación de 5-HT se da por una vía de transportadores dependientes de Na^+/Cl^- que permite recapturar a la serotonina después de iniciado el estímulo (SERT; Fuller y Wong, 1990), lo que permite regular la concentración de 5-HT extracelular en la mayoría de las regiones del cerebro.

La Serotonina en la Fisiología Reproductiva Masculina.

Desde sus primeros años de su descubrimiento por Rapport *et al.*, (1948) se determinó que la síntesis de 5-HT ocurría, principalmente a nivel del tallo cerebral, aunque también se han detectado otros sitios donde ocurre este proceso en el cerebro (Iceta-Echave, 2008). En cuanto al aparato reproductor masculino, se ha reportado que existe 5-HT en las células de Leydig de los testículos (Vanhoutte, 1985; Frungieri *et al.*, 1999; Tijmes *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 1990), en el epidídimo y glándulas sexuales accesorias (Jiménez-Trejo *et al.*, 2007; Pichardo *et al.*, 2011).

Shishkina y Borodin (1989), indican que la 5-HT a través del SNC participa en las diferentes etapas del desarrollo gonadal, actuando como un factor modificante en la producción de testosterona y la función endocrina de los testículos de mamíferos como la rata afectando su desarrollo sexual, en que dependiendo de los niveles de 5-HT hipotalámica provoca una disminución del peso testicular, vesículas seminales y el número de espermatozoides maduros en el epidídimo. Funcionando como regulador neuroendocrino en la maduración sexual de machos prepuberales en diferentes etapas del desarrollo; en algunos momentos del desarrollo corporal o estacional incrementará la producción de testosterona mientras que en otros, la disminuirá (Shishkina y Dygalo, 2000; Aragón *et al.*, 2005).

Campos *et al.* (1990), mencionan que la 5-HT se localiza en los compartimentos testiculares, específicamente en las células de Leydig y en la capsula testicular. En la zona de la cabeza del epidídimo también se han identificado componentes que forman parte del sistema serotoninérgico (TPH1, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT_T), específicamente en el epitelio epididimal (Jiménez-Trejo *et al.*, 2007), indicando que existe un sistema de síntesis local en este órgano.

Según Csaba *et al.*, (1998), la 5-HT testicular pudiera tener un efecto parácrino, ya que influye de manera inhibitoria en las células de Leydig y las células musculares controlando la espermatogénesis de manera negativa, mientras que en el conducto deferente actúa a través de la musculatura lisa al momento de la eyaculación para la correcta contracción muscular que participa en la expulsión del semen (Lychkova y Potapova, 2006). Por un lado de acuerdo a lo que reporta Tijmes *et al.*, (1996) señalan que puede influir directamente en las células de Leydig y éstas a su vez en la producción de testosterona; y por otro, hay reportes que indican que la administración de 5-HT inhibe la producción de testosterona, probablemente induciendo la involución testicular, sobre todo en especies de mamíferos cuyos ciclos circadianos o circanuales dependen de la exposición a la luz solar (Kus *et al.*, 2002; Turek *et al.*, 1976).

Así mismo, se ha descrito que la 5-HT se encuentra en la cápsula testicular donde su secreción es estimulada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GNRH; Dufau *et al.*, 1993), y que actúa a través de receptores de alta afinidad ubicados en la membrana de estas células como un regulador negativo de la acción de la hormona luteinizante (LH) e inhibe a las gonadotropinas inducidas por la disminución del AMPc y la producción de andrógenos. También la secreción del factor liberador de corticotropina (CRF) por las células de Leydig es estimulado por la LH, actuando a través de la liberación de 5-HT y la activación autócrina de los receptores para 5HT₂ (Dufau *et al.*, 1993).

Syed *et al.*, (1999), menciona que cuando se sintetiza 5-HT simultáneamente hay una disminución en la producción de testosterona y peso testicular; y a concentraciones altas se causa una degeneración de células durante la espermatogénesis hasta la pérdida completa del epitelio germinal, llegando a provocar isquemia y atrofia testicular.

La Serotonina en Murciélagos.

En los murciélagos se han realizado varios estudios sobre el sistema serotoninérgico, pero principalmente a nivel del SNC, por ejemplo en *Myotis lucifugus* Nunez *et al.* (1981) determinó la concentración de 5-HT en la hipófisis encontrando una fluctuación estacional que tiene que ver con su ciclo de vida; por otro lado, Payette *et al.* (1986) encontró que la 5-HT endógena co-localiza con la hormona luteinizante (LH) en la hipófisis anterior; mientras que Bauman *et al.* (1989) describe los cambios de esta monoamina y sus metabolitos en la corteza cerebral; Yoshida *et al.* (1982) realizó un mapa inmunohistoquímico de las neuronas serotoninérgicas en *Pipistrellus abramus*; en *Tadarida brasiliensis* Hurley y Thompson (2001), vieron que la 5-HT modula el procesamiento central auditivo por lo que desempeña un papel especial en el procesamiento auditivo; para *Miniopterus schreibersii* (Maseko y Manger, 2007) y para *Rousettus aegyptiacus* (Maseko *et al.*, 2007); se describió la regionalización nuclear y la morfología neuronal serotoninérgica; en los murciélagos *Eidolon helvum* y *Epomophorus wahlbergi* se observó la organización del complemento nuclear de los sistemas neuromoduladores (Dell *et al.*, 2010); y en el murciélago *Cynopterus sphinx*, Ganesh *et al.* (2010) estudió el papel de la 5-HT en el bulbo olfatorio, encontrando que esta puede regular el aprendizaje y la memoria olfativa.

Con respecto al sistema serotoninérgico y su participación en la reproducción de murciélagos hasta el momento no se contaba con ningún estudio hasta este trabajo, por lo que nos dimos a la tarea de caracterizar la localización y concentración por primera vez de los componentes serotoninérgicos en el testículo y epidídimo del murciélago *M. velifer* (Jiménez-Trejo *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN

El murciélago *Myotis velifer* es una especie estacional, con un solo ciclo reproductivo al año y con funciones sexuales masculinas desfasadas temporalmente, donde existen cambios morfológicos gruesos en sus órganos sexuales asociados a cambios microestructurales relativos a sus procesos reproductivos (como la espermatogénesis en el testículo y la maduración y el almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo), es así que contamos con un modelo natural de una especie de vida silvestre que nos permitirá dar aproximaciones fisiológicas de la participación de la serotonina y el control neuroendocrino de las modificaciones estructurales de los órganos sexuales y de su probable participación en los procesos reproductivos que se llevan a cabo asincrónicamente; en el que la serotonina participa en la regulación de los niveles de testosterona en testículo, por lo que puede ser un componente importante que permitirá reconocer como se regula el patrón reproductivo masculino asincrónico de la especie.

HIPÓTESIS

Considerando el papel que se le ha reconocido a la serotonina en la función de esteroidogénesis del testículo, particularmente su participación en el control de la liberación de testosterona en función de su concentración, en el murciélago *Myotis velifer* estacional con asincronía entre las funciones sexuales masculinas, la concentración alta de serotonina deberá presentarse durante el periodo de inactividad de espermatogénesis, mientras que la menor concentración de serotonina se presentará durante el periodo de actividad de espermatogénesis.

OBJETIVO GENERAL

Reconocer la participación de algunos de los principales componentes del sistema serotoninérgico en la regulación del patrón reproductivo masculino asincrónico del murciélago *Myotis velifer*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la presencia de serotonina en el testículo de murciélagos *Myotis velifer* en las etapas de actividad e inactividad de espermatogénesis dentro del ciclo reproductivo de la especie.
- Determinar la concentración de serotonina en testículo y epidídimo de murciélagos *Myotis velifer* en las etapas de espermatogénesis y de maduración-almacenamiento espermático en el epidídimo dentro del ciclo reproductivo de la especie.
- Determinar la presencia y la concentración de las enzimas Triptófano Hidroxilasa y Monoamina Oxidasa A en el murciélago *Myotis velifer* en las etapas de espermatogénesis y de maduración-almacenamiento espermático en el epidídimo dentro del ciclo reproductivo de la especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Trabajo de Campo.

Debido a que se tienen los reportes de que las poblaciones de *Myotis velifer* en el centro de México (Arratia, 2000) se encuentran distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal de manera estacional (López-Wilchis y León-Galván datos no publicados), donde realizan diferentes aspectos de su biología como lo es la hibernación, y tomando en cuenta nuestras propias observaciones sobre la dinámica de los procesos reproductivos de los machos, que indican que la espermatogénesis se realiza en zonas de altitud intermedia (alrededor de los 1000 msnm) y los apareamientos a altitudes mayores (alrededor de 3000 msnm) previo o durante la hibernación, se decidió establecer un muestreo para obtener murciélagos machos adultos sexualmente maduros en tres localidades diferentes (figura 5), de acuerdo a la fecha del año en la que se realizan los procesos de interés para este estudio.

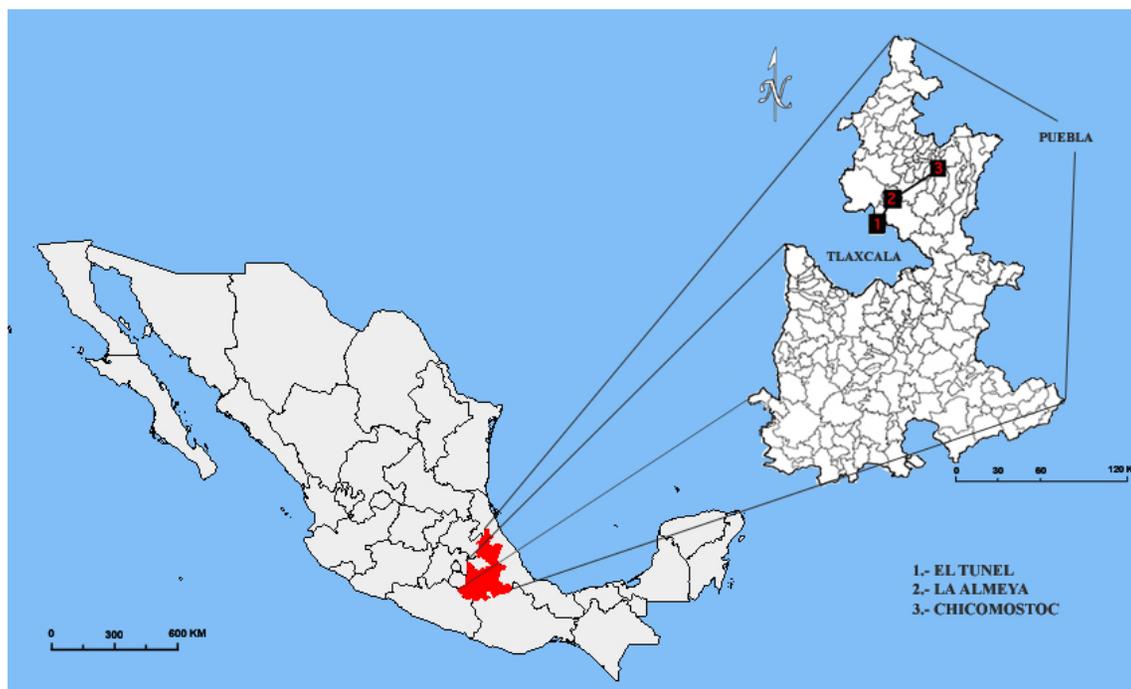


Figura 5. Esquema que muestra las 3 localidades de captura de los murciélagos *Myotis velifer* para éste estudio en los estados de Puebla y Tlaxcala de la República Mexicana.

Se realizaron visitas durante el mes de marzo a una Hacienda abandonada conocida como “La Almeyá” (figura 6A), localizada en las coordenadas 19°47'46”N y 97°56'01”W, a 2100 msnm, dentro del municipio de Aquixtla, Puebla, de donde se capturaron murciélagos en condición de completa inactividad reproductiva (organismos considerados como control) y poder tener datos comparativos respecto a los animales de fechas en que hay actividad reproductiva.

Posteriormente se realizaron dos visitas a otras localidades diferentes para obtener ejemplares en las etapas del ciclo reproductivo que fueron del interés de éste trabajo. La primera de estas dos visitas se hizo en julio, mes en el que los murciélagos se encuentran en la fase de espermatogénesis, a una zona baja del estado de Puebla. Se trata de la cueva “Chicomostoc” (figura 6B) localizada en las coordenadas 19°57'54”N y 97°36'09”W, a 1420 msnm, ubicada en las cercanías del poblado de Nauzontla, Puebla. La tercera salida se hizo en el mes de noviembre, cuando los murciélagos se encuentran en zonas altas, y que es donde se realizan los apareamientos y la hibernación. Para ésta ocasión, los murciélagos se capturaron al interior de un “Túnel” que utilizan como refugio, y que se encuentra entre las coordenadas 19°37'14”N y 98°02'02”W, a 3220 msnm, y que está localizado en la Sierra de Tlaxco, en la línea limítrofe entre los estados de Tlaxcala y Puebla (figura 6C).

En cada uno de los tres sitios de captura, se seleccionaron 10 ejemplares adultos, cuya categoría de edad (adulto) fue determinada de acuerdo a las características somáticas (peso corporal y longitud del antebrazo) de los individuos (Fitch *et al.*, 1981) y fundamentalmente en función de presentar la completa osificación de las placas de crecimiento epifisial de los huesos metacarpo-falange del tercer y cuarto dedos de la mano de acuerdo a Anthony (1988).



Figura 6. Fotografías de las localidades de captura de *Myotis velifer* en los estados de Puebla y Tlaxcala. **A)** Hacienda la Almeya en el municipio de Aquixtla; **B)** Cueva Chicomostoc en Nauzontla, Puebla; **C)** El Túnel del lado seco y **C')** lado húmedo, en la Sierra de Tlaxco, Tlaxcala-Puebla.

Es importante mencionar que *M. velifer* no se encuentra en la lista de especies con categoría de riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010), por ser abundante y de amplia distribución en México, por lo que el tamaño de muestra seleccionado para la realización del presente estudio no implica un impacto mayor a sus poblaciones.

Los murciélagos se capturaron con diferente tipo de instrumento (redes de golpe, redes de niebla y trampas arpa; figura 7), según se requirió en cada una de las diferentes localidades de captura. Cada murciélago seleccionado se mantuvo de manera individual en bolsas de manta para su posterior procesamiento, mismo que fue realizado directamente en campo, lo que implicó que los murciélagos no permanecieran por más de 12 hrs en condiciones de cautiverio. De cada individuo se registraron y evaluaron dos de sus principales características somáticas como fueron: el peso corporal, obtenido por medio de una balanza electrónica portátil Ohaus® (± 0.1 g), y la longitud del antebrazo, obtenido con un calibrador vernier Scala (± 0.1 mm). También se registraron datos reproductivos para establecer la condición sexual al momento de la captura, que incluye la posición y apariencia externa de los testículos y epidídimos.



Figura 7. Imagen en la que se muestran las diferentes redes de captura utilizadas para este estudio. **A)** Red de golpe; **B)** Red de niebla, **C)** Red de arpa y **C')** Murciélagos capturados con la red de arpa.

Los murciélagos se sacrificaron por decapitación después de haber sido anestesiados con éter. Inmediatamente después se colectó la sangre que fluye libremente, en un tubo eppendorf de 2.5 ml, y se preservó por congelación en hielo seco. En seguida, se procedió a disecar los testículos y epidídimos, para registrar sus medidas (diámetro mayor y menor del testículo; y longitud del epidídimo) con el vernier (± 0.1 mm).

Una vez extraídos, los órganos sexuales fueron medidos con el vernier (testículo: diámetro mayor y menor en ángulos rectos, epidídimo: longitud), y finalmente congelados por inmersión en hexano enfriado en hielo seco por 3 minutos, para posteriormente ser almacenados en criotubos y conservados en el hielo seco, para ser transportados al laboratorio en la UAM-Iztapalapa, donde se mantuvieron en congelación a -70°C , así como también la sangre, hasta su posterior procesamiento.

Trabajo de Laboratorio.

Histoquímica por el método de Falck Hillarp para detección de 5-HT.

El método de Falck-Hillarp es una técnica específica y segura para identificar indolaminas como 5-HT y catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Consiste en inducir la modificación de las moléculas de 5-HT por la combinación de paraformaldehído y ácido glioxílico en un sistema de cambios de temperatura, de frío inicial (4°C) y calor posterior ($\approx 100^{\circ}\text{C}$).

El mecanismo de la reacción consiste primeramente en la ciclación de Pictet-Spengler, produciendo 1,2,3,4-tetrahidrosiquinolina-1-ácido carboxílico o 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina-1-ácido carboxílico, que tienen la cualidad de emitir una fluorescencia muy débil, seguido de la formación de compuestos altamente fluorescentes por diferentes vías: ya sea por descarboxilación autooxidativa de derivados 3,4-dihidro o por reacciones intramoleculares catalizadas por una segunda molécula de ácido glicólico para producir el compuesto 2-carboximetil (Lindvall y Björklund, 1974).

Los testículos de cuatro murciélagos de cada una de las 3 diferentes etapas del ciclo anual fueron cortados transversalmente en un criostato (Leyca®) a -20°C con un grosor de $12\ \mu\text{m}$, montándose de 3 a 5 cortes de cada una de estas etapas por laminilla, previamente cubiertas con poli L-lisina (ANEXO II) para evitar se desprendan los tejidos durante el procedimiento. Los portaobjetos con los tejidos se colocaron en una cámara de vacío durante 15 minutos; enseguida las laminillas con los tejidos se colocaron en una solución que contiene 1% paraformaldehído y 8% de ácido glicólico en solución de buffer de fosfatos (PBS; 0.1 M, pH 7.4; ANEXO II) en frío a 4°C durante 10 minutos.

Las muestras se secaron e inmediatamente fueron incubadas a una temperatura aproximada de 100°C por 10 minutos. Se les colocó una sonda específica para contrastar núcleos de las células llamada Hoechst 33258 (Hoechst) a los tejidos para permitir observar señales co-localizadas. Después de tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS, las secciones se montaron con un medio comercial especial para fluorescencia (Medio de Montaje Fluorescente, DAKO, DakoCytomation, CA, USA); las moléculas se consideraron positivas a 5-HT si se presentan en pequeño tamaño con fluorescencia amarilla (Klemm, 1982).

Cortes de cerebro de *M. velifer* con un grosor de 12 μm se utilizaron como control positivo de la técnica. Las laminillas fueron observadas bajo un microscopio Nikon E600 equipado con una cámara digital (Nikon, Melville, NY) con la que se tomaron las microfotografías.

Inmunofluorescencia para localizar 5-HT en testículo.

Los testículos de seis murciélagos de cada una de las etapas del ciclo anual de *M. velifer*, fueron cortados en el criostato a -20°C con un grosor de 12 μm , montándose de 3 a 5 cortes por laminilla de cada una de las etapas, previamente cubiertas con poli L-lisina (ANEXO II) para evitar se desprendan los tejidos durante el procedimiento; las laminillas con los tejidos se colocaron en una cámara de vacío durante 15 minutos y en seguida se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% disuelto en buffer de fosfatos (PBS; 0.1 M, pH 7.4). Para detectar la 5-HT en las laminillas, se procedió de acuerdo con lo descrito por Jiménez-Trejo *et al.* (2007), en la que las laminillas se colocaron en citrato de sodio (pH 6.0; ANEXO II) caliente (aprox. 50°C) en 2 tiempos de 10 min c/u; después se realizaron 3 lavados de 5 min c/u con PBS y se dejaron en suero de bloqueo (3 % a pH 7.0) durante 2 hrs.

En la caracterización de la 5-HT se usaron anticuerpos para confirmar su especificidad y reactividad-cruzada: “mouse monoclonal anti 5-HT” (1:100, Genetex Inc. Irvine, California, USA) y “goat anti mouse policlonal” (1:200, Merck Millipore Corporation, Billerica, MA, USA); entre anticuerpos se realizaron 3 lavados de 5 min c/u con PBS; se les colocó una sonda específica (Hoechst) para contrastar núcleos de las células; las laminillas se montaron inmediatamente con un medio comercial especial para fluorescencia (Medio de Montaje Fluorescente, DAKO, DakoCytomation, CA, USA).

Cortes de 12 μm de grosor del cerebro de *M. velifer* se utilizaron como control positivo de la técnica. En los experimentos control, las laminillas se incubaron con suero preinmune. Finalmente las laminillas fueron observadas bajo un microscopio Nikon E600 equipado con una cámara digital (Nikon, Melville, NY) con la que se tomaron las microfotografías.

Inmunotransferencia por Western Blot para detectar las proteínas TPH y MAO_A.

Para esta técnica se usaron los testículos y los epidídimos de 6 y 3 murciélagos respectivamente por fecha de captura que fueron lisados con 500 μL de RIPA (ANEXO II), primero el homogenizado se hizo mecánicamente con un homogeneizador (Polytrón® PT2100) y después se pasaron por un sonicador (Sonics & Materials Inc, vibra cell™, USA), se aplicaron 2 pulsos de 20 segundos con una amplitud de 20 % y 2 pulsos de 15 segundos con una amplitud de 30 %, con intervalos de descanso de 10 segundos entre cada pulso; manteniendo las muestras en un recipiente con hielo para evitar su calentamiento, el homogenizado fue centrifugado a 16200g durante 40 minutos a 4 °C; el sobrenadante se recuperó en un eppendorf de 1.5 ml y fue guardado a -70° C hasta su uso.

Las proteínas obtenidas del homogenizado para estas muestras fueron previamente cuantificadas con un espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek® Instruments, USA), para conocer su concentración, en la que se realizó una curva estándar de albumina sérica de bovino con RIPA mediante el método de Bradford (1976; ANEXO III). En la cuantificación se colocaron 2 μL de la muestra de cerebro, testículo o epidídimo, con 8 μL de H₂O destilada más 200 μL de Bradford.

El Western Blot es una técnica que se basa en la separación de las proteínas por su tamaño molecular, mediante electroforesis en un gel de acrilamida con SDS (SDS-PAGE), para la corrida de la electroforesis en el sistema de Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) que se realizó en tres diferentes experimentos, se colocaron 30 µg/µL de proteína de testículo o epidídimo en cada carril del gel previamente preparados (ANEXO II), una vez montados los geles se agregó el buffer de corrida y se cargaron con las proteínas, y 7 µL de marcador de peso molecular (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en el primer carril.

La corrida se inició con una corriente eléctrica de 80 volts durante 20 minutos para permitir el alineamiento de las proteínas y posteriormente se subió a 125 volts hasta que terminaran de recorrer el gel, durante 2 horas con 20 minutos aproximadamente; posteriormente se realizó una transferencia semiseca con una cámara Trans-Blot SD Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a una membrana de nitrocelulosa (previamente activada con metanol absoluto), mediante la aplicación de una corriente eléctrica de 300 mA durante 1 hora con 20 minutos. Una vez hecha la transferencia las membranas se dejaron durante 1 hora en suero de bloqueo (10 % p/v, leche en TBS tween), seguido de 5 lavados de 4 min c/u con TBS y después se procedió a la detección de la proteína de las enzimas TPH y MAOA, mediante el uso de un anticuerpo “goat policlonal anti-TPH” (C-20; 1:2500) y de “rabbit policlonal anti-MAOA” (1:3500) de Santa Cruz Biotechnology Inc., EE.UU respectivamente; entre cada anticuerpo se realizaron 5 lavados de 4 min c/u con TBS.

Finalmente, usando un kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.) se recogió la señal producida mediante impresión en una película fotográfica. Las imágenes de estas películas fueron capturadas, digitalizadas, y analizadas densitométricamente con el software Image J v.1.46 (EE.UU. Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Maryland, EE.UU.) para determinar su variación entre las tres etapas de estudio.

Cuantificación de 5-HT por ELISA.

La cuantificación de 5-HT se realizó en plasma sanguíneo y en tejidos testicular y epididimario utilizando el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (de sus siglas en inglés ELISA). Para obtener el plasma sanguíneo, la sangre de cada uno de 3 murciélagos por etapa de estudio se descongeló y se centrifugó a 16200 X g durante 15 minutos a 4 °C.

En el caso de la cuantificación en tejidos, se utilizaron testículos y epidídimos de 3 murciélagos, así como cerebros de esos mismos murciélagos como control. Cada órgano primero fue homogenizado mecánicamente con un homogeneizador Polytrón® (modelo PT2100) utilizando un buffer de Glicina-HCl 0.2 M pH 2.2 (1:20 P/V para testículos y epidídimos, y 1:5 P/V para cerebros; ANEXO II) y después sonicados con un sonicador (Sonics & Materials Inc, vibra cell™, USA), aplicando 4 pulsos de 15 segundos con una amplitud de 30% con intervalos de descanso de 10 segundos entre cada uno; las muestras se mantuvieron siempre dentro de un recipiente con hielo; los homogenizados se centrifugaron a 16200 X g durante 40 min a 4 °C, se obtuvieron los sobrenadantes y se guardaron en tubos eppendorf de 1.5 ml a -70° C, hasta su cuantificación.

La 5-HT se cuantificó por triplicado con un kit comercial ultrasensible (ALPCO Diagnostics 17-SERHU-E01-RES) siguiendo las instrucciones del proveedor; en la que primeramente se realizó un acilado de las muestras: que consiste en colocar 100 µl de los estándares diluidos, 100 µl del control diluido y 10 µl del homogenizado de cerebro, plasma sanguíneo, testículo o epidídimo según fuera el caso en la placa de acilación; se agregaron 90 µl del buffer diluyente y se adiciona 25 µl de buffer de acilación. Se deja acilando durante 30 min a temperatura ambiente (20-25 °C) en agitación a 600 rpm aproximadamente.

Para la cuantificación de la 5-HT se colocan 100 µl de la muestra acilada en cada uno de los pozos de la placa de ELISA, se adicionaron 25 µl del antisuero de serotonina y se cubrió la placa con una etiqueta adhesiva, dejándose en incubación durante 18 horas a 4 °C.

Se realizó un lavado de los pozos con 300 µl de buffer de lavado por tres ocasiones; después se agregaron 100 µl del conjugado de enzima y se incubó durante 30 min a una temperatura ambiente (20-25 °C) en agitación a 600 rpm.

Se descartó el contenido de los pozos y se lavó con 300 µl de buffer de lavado por tres ocasiones, posteriormente se agregaron 100 µl del sustrato y se incubó 30 minutos a una temperatura ambiente (20-25 °C) en agitación a 600 rpm aproximadamente, evitando ser expuestas a la luz directamente.

Se adicionaron 100 µl de la solución de paro y se leyó la absorbancia a 450 nm utilizando las longitudes de onda de referencia de 620 nm y 650 nm, en un espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek® Instruments, USA).

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Para todos los parámetros analizados se realizó una comparación entre las tres diferentes etapas de estudio que incluyeron los dos principales procesos reproductivos masculinos del murciélago *Myotis velifer* y la etapa de inactividad reproductiva como control, realizándose una prueba de ANDEVA de una vía (Sokal and Rohlf, 1995), seguido de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa NCSS. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

RESULTADOS.

Patrón reproductivo masculino asincrónico del murciélago *Myotis velifer* en el centro de México.

Con el análisis de los datos obtenidos en campo durante el presente estudio, y aprovechando los datos existentes y que no habían sido analizados para la especie en la misma zona de estudio a partir de los 80's y hasta la fecha, se estableció el patrón reproductivo masculino del murciélago *M. velifer* que habita en el centro de México, mostrando el patrón característico con un único ciclo reproductivo, asincrónico de la especie reportado por Krutzsch (2009) para poblaciones del sur de Estados Unidos, pero con ciertas diferencias temporales, y principalmente en que para las poblaciones que se encuentran en la zona de estudio de éste trabajo (ver figura 5), los principales procesos y eventos reproductivos de la especie se llevan a cabo en diferentes localidades ubicadas a lo largo de un gradiente altitudinal de la Sierra Norte de Puebla y Sierra de Tlaxco, en Tlaxcala (figura 8).

Tomando en cuenta lo anterior y considerando las medidas de los testículos (diámetro mayor y menor), y epidídimos (longitud) de los ejemplares de *M. velifer* capturados, así como los datos correspondientes para otros organismos capturados en estudios realizados previos a este por parte del grupo de investigación, pero que no habían sido analizados, se estableció el patrón de cambios morfológicos mensuales de los principales órganos sexuales a lo largo del ciclo anual (figura 9) en la zona de estudio. Se pudo apreciar que el incremento en tamaño de los testículos comienza en abril (valores promedio $4.7 \text{ mm} \pm 0.86 \text{ mm}$ diámetro mayor (Dmay) y $2.8 \text{ mm} \pm 0.44 \text{ mm}$ diámetro menor (Dmen)), alcanzando el mayor tamaño en junio (promedio $7.1 \text{ mm} \pm 1.08 \text{ mm}$ Dmay y $4.6 \text{ mm} \pm 0.77 \text{ mm}$ Dmen), seguido de una involución para agosto (promedio $3.8 \text{ mm} \pm 0.45 \text{ mm}$ Dmay y $2.4 \text{ mm} \pm 0.11 \text{ mm}$ Dmen) (figura 9A), mes en el que el epidídimo completo alcanza su mayor tamaño (promedio $11.9 \text{ mm} \pm 1.0 \text{ mm}$; figura 9B) y mostrando el menor tamaño en septiembre ($7.1 \text{ mm} \pm 2.1 \text{ mm}$).

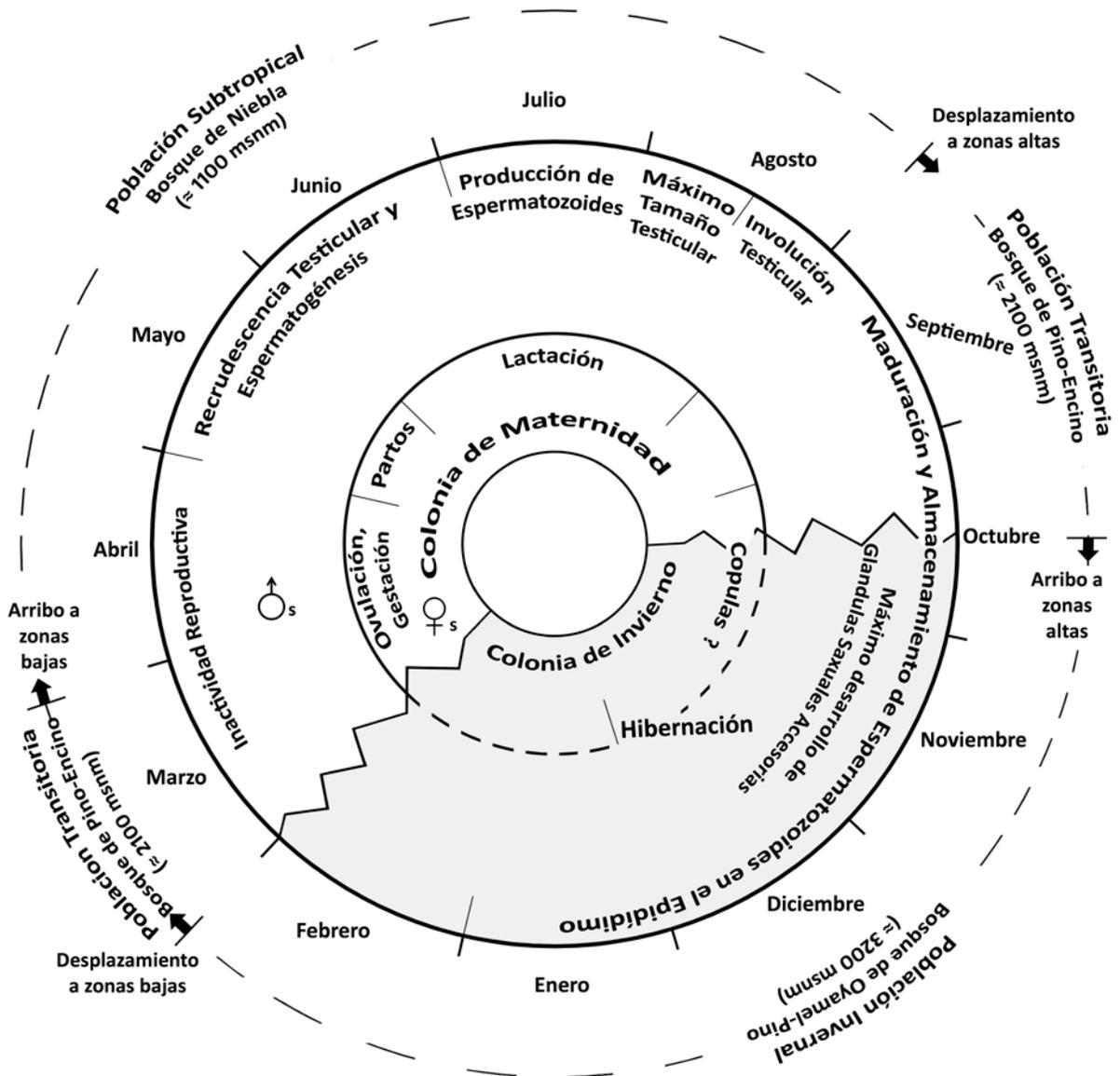


Figura 8. Esquema que muestra los diferentes procesos y eventos reproductivos del murciélago *Myotis velifer*, como se presentan en la región central de México, basado en Racey (1974), y Krutzsch, (2009), además de datos de campo obtenidos por nuestro grupo de investigación desde los años 80's (Arratia, 2000; López-Wilchis, y León-Galván datos no publicados).

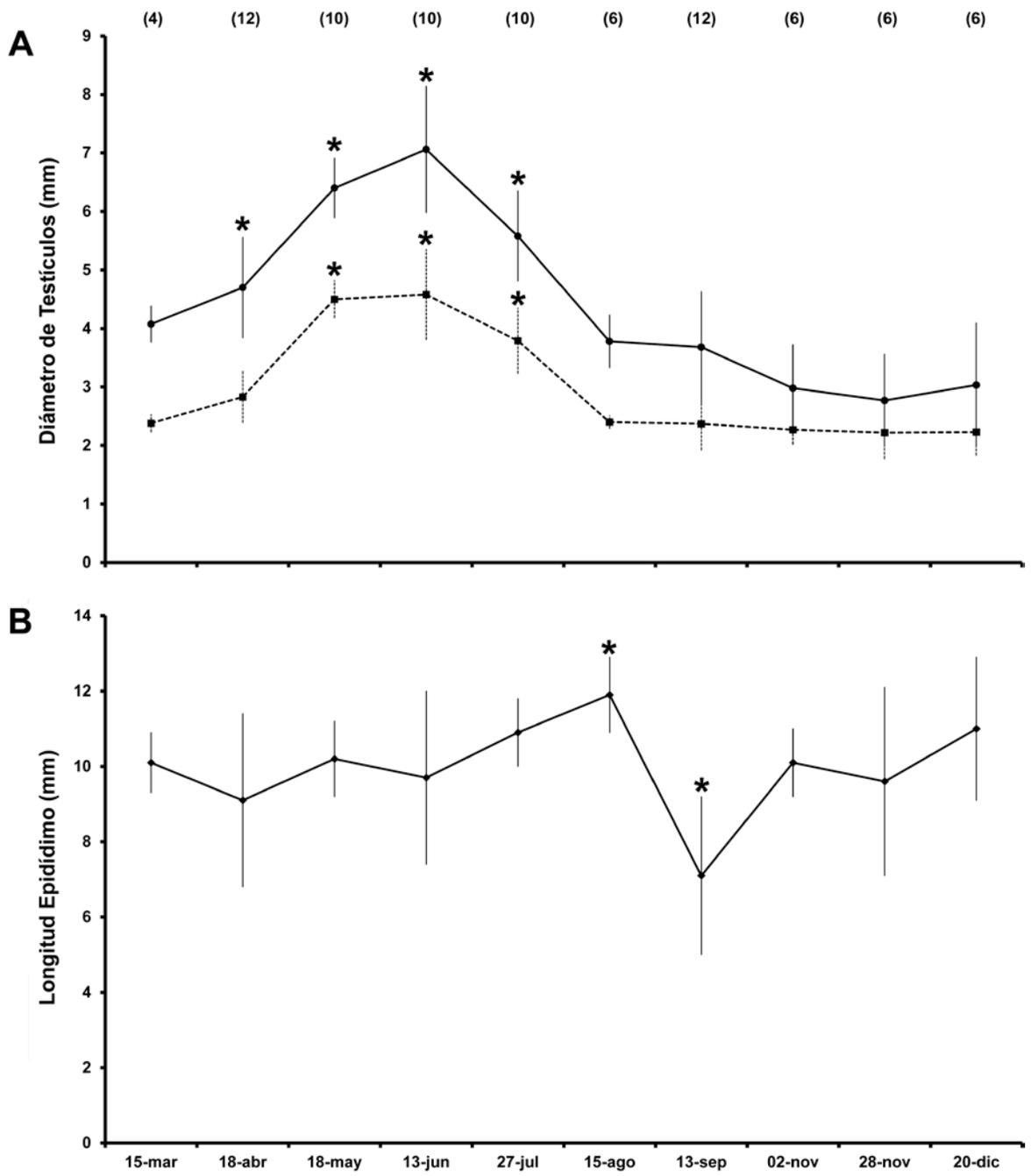


Figura 9. Variación promedio mensual \pm desviación estándar en el tamaño de los órganos sexuales masculinos de individuos adultos, sexualmente maduros del murciélago *Myotis velifer* a lo largo de un ciclo anual. **A)** Diámetro mayor (—) y diámetro menor (- -) de los testículos; **B)** Longitud del epidídimo (—). El valor en paréntesis indica el número de órganos que fueron medidos por mes, ANDEVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey, * $p < 0.05$ entre meses de estudio.

Detección y localización de 5-HT en el testículo del murciélago *Myotis velifer*

a) Detección de 5-HT por el método histoquímico de Falck Hillarp.

Para determinar la presencia de 5-HT se utilizaron como control positivo cortes de cerebro de los mismos murciélagos *M. velifer* de estudio, donde se localizaron vesículas de 5-HT distribuidas en el citoplasma alrededor del núcleo en neuronas del rafe (figura 10A). Ya en el caso particular del tejido testicular de los murciélagos de estudio, se detectó la presencia de 5-HT en forma de vesículas en el tejido intersticial en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de ésta especie de murciélago (figura 10B-D).

En Marzo, cuando los individuos se encuentran sexualmente inactivos, se observaron agrupaciones de lo que deben ser células de Leydig llenas con vesículas positivas a 5-HT, rodeando a los túbulos seminíferos que presentan una luz cerrada (figura 10B). En la etapa de espermatogénesis (Julio) la luz de los túbulos seminíferos ya se encuentra completamente abierta y se observaron vesículas positivas a 5-HT dispersas y en forma heterogénea, en comparación con la etapa de inactividad reproductiva (figura 10C). Por otra parte, en la etapa en la que el testículo ha involucionando (Noviembre) y los apareamientos se llevan a cabo gracias al reservorio de espermatozoides que existe en la cauda del epidídimo, la luz de los túbulos seminíferos se presenta de forma irregular, también se observaron marcas positivas correspondientes a 5-HT dentro de los túbulos seminíferos, con una distribución que se presenta del compartimento basal hacia el compartimento adluminal en el epitelio seminífero, lo que sugiere que la 5-HT está contenida en células de Sertoli (figura 10D).

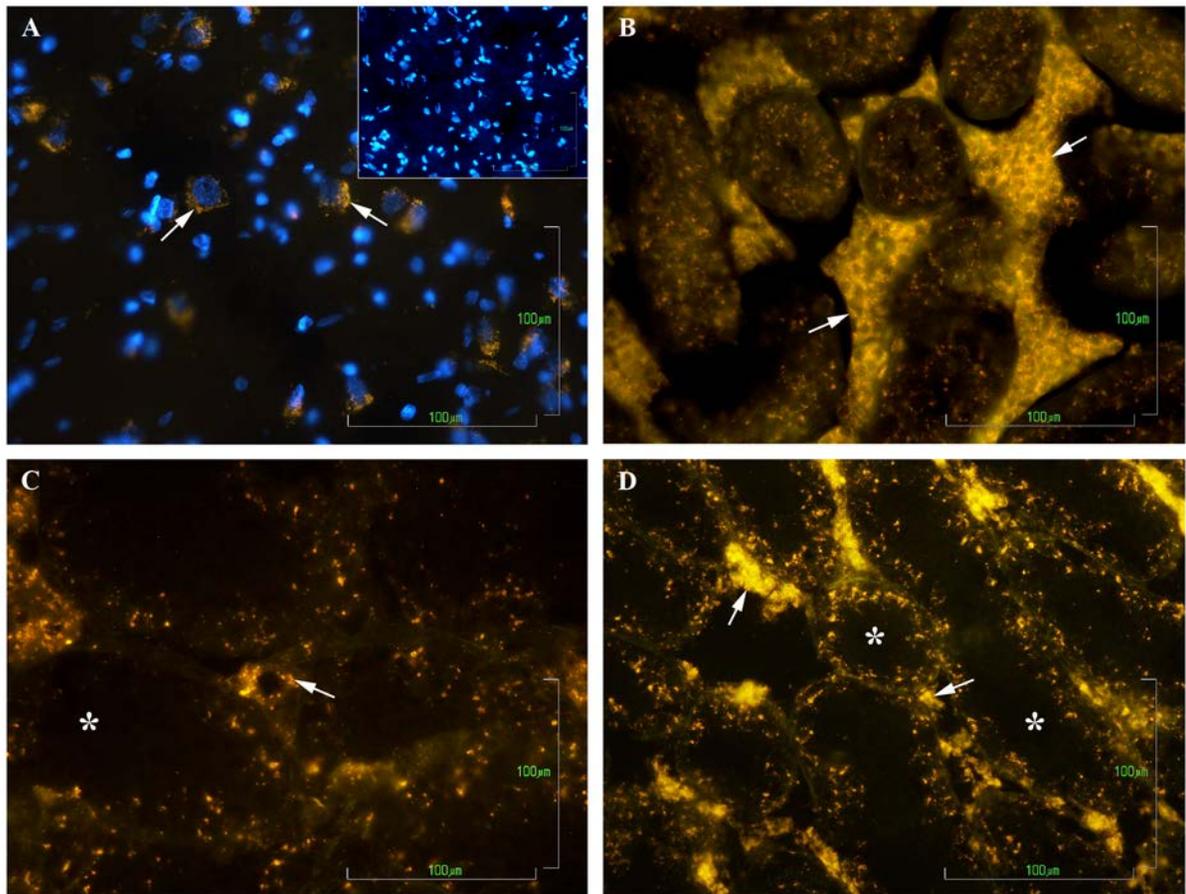


Figura 10. Microfotografías representativas de cortes del cerebro (utilizado como control) y testículos de murciélagos adultos de *Myotis velifer*. **A)** Cerebro, control positivo, en recuadro inserto es el control negativo; **B)** testículo en etapa de inactividad reproductiva (Marzo); **C)** testículo en etapa de espermatogénesis (Julio), y **D)** testículo en inactividad de espermatogénesis (Noviembre). Las flechas muestran vesículas positivas a 5-HT, y los asteriscos ubican la luz de los túbulos seminíferos. Magnificación: 40 X.

b) Detección de 5-HT por el método de inmunofluorescencia.

Al utilizar de manera complementaria una técnica de inmunofluorescencia se confirmó la presencia de 5-HT tanto en secciones histológicas de cerebro (control positivo de la técnica; inserto de la figura 11A), como en los tejidos testiculares de murciélagos *M. velifer* en sus diferentes etapas del ciclo reproductivo. Para la etapa de inactividad reproductiva (Marzo) se observó la presencia de vesículas que mostraron fluorescencia indicativa de 5-HT en pocas células positivas del tejido intersticial, en lo que se puede considerar que son células de Leydig (figura 11A). En la etapa de espermatogénesis (Julio), en el testículo se presentaron marcas fluorescentes en grupos de células de Leydig positivas a 5-HT (figura 11B), los túbulos seminíferos muestran un diámetro mayor con respecto a la etapa anterior (de inactividad sexual). En la etapa cuando el testículo ya se encuentra en inactividad de espermatogénesis (Noviembre), pero que es cuando se llevan a cabo los apareamientos, se observó claramente una inmunolocalización en el citoplasma de lo que podrían ser células de Leydig en la zona intersticial, así como vesículas positivas a 5-HT en algunos túbulos seminíferos, que para esta etapa, su luz se observa de forma irregular en tamaño y forma (figura 11C), y en la que los testículos presentan el menor tamaño (figura 9A).

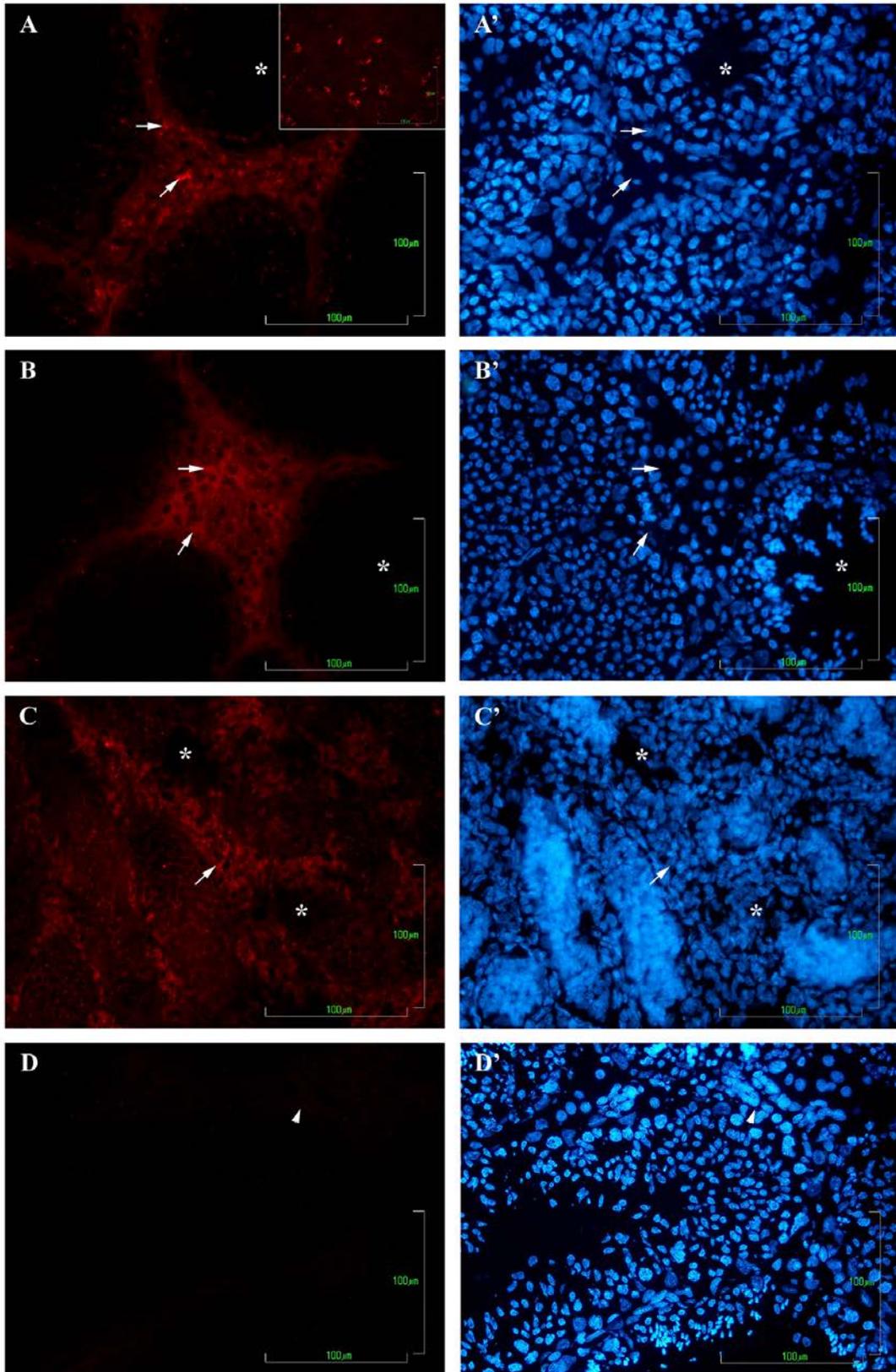


Figura 11. Microfotografías de secciones histológicas del testículo de murciélagos *M. velifer* en sus diferentes etapas del ciclo de reproducción anual, donde se aprecia la detección de serotonina por inmunofluorescencia. **A)** Testículo en etapa de inactividad reproductiva (Marzo), en el recuadro se observan neuronas 5-HT positivas localizadas en el tallo cerebral (control positivo). **B)** Testículo en etapa de espermatogénesis (Julio). **C)** Testículo en etapa de involución (Noviembre). **D)** Testículo usado como control negativo. En **A', B' C'** y **D'** se presentan fotografías con el uso de sondas específicas para núcleos (Hoechst) en color azul, correspondientes al mismo campo de observación del tejido con marcaje positivo para serotonina en color rojo de las figuras **A, B, C** y **D**. Las flechas muestran la localización exacta de las vesículas positivas a 5-HT; mientras que la punta de flecha en **D**, señala la posición de una célula sin marca positiva a 5-HT). El asterisco indica la ubicación del lumen del túbulo seminífero. Magnificación: 40 X.

Detección de las enzimas de TPH y MAO_A por Western Blot en testículo y epidídimo del murciélago *Myotis velifer*.

Se registró la presencia de las enzimas TPH y MAO_A en las muestras de homogeneizados de testículo y epidídimo del murciélago *M. velifer*, presentando variación en su expresión durante las diferentes etapas del ciclo reproductivo que fueron analizadas.

El cerebro de algunos murciélagos *M. velifer* fue utilizado como control positivo, y como control de carga de proteínas se utilizó β -actina (figura 12C). Los resultados obtenidos por ésta técnica muestran la presencia de dos bandas de proteínas tanto para testículo como para epidídimo, una de las bandas se encuentra en el intervalo de peso molecular de \approx 48 kDa correspondiendo con la enzima TPH (figura 12A), y la otra banda de \approx 61 kDa que corresponde a la MAO_A (figura 12B).

El análisis densitométrico de las placas radiográficas correspondientes para los Western Blots de las enzimas TPH y MAO_A indicó diferencias en la intensidad de las bandas inmunomarcadas correspondiendo con las diferentes etapas del desarrollo testicular y epididimario. En cuanto a la TPH se presentó un patrón de expresión donde la mayor densidad se presentó en Marzo tanto para el testículo como para el epidídimo, con un descenso en las otras etapas analizadas (Julio, Noviembre) (figura 12D); mientras que la enzima MAO_A presentó un patrón diferente, casi inverso al correspondiente para la TPH, ya que la mayor densidad fue observada tanto en testículo como en epidídimo en noviembre (figura 12E).

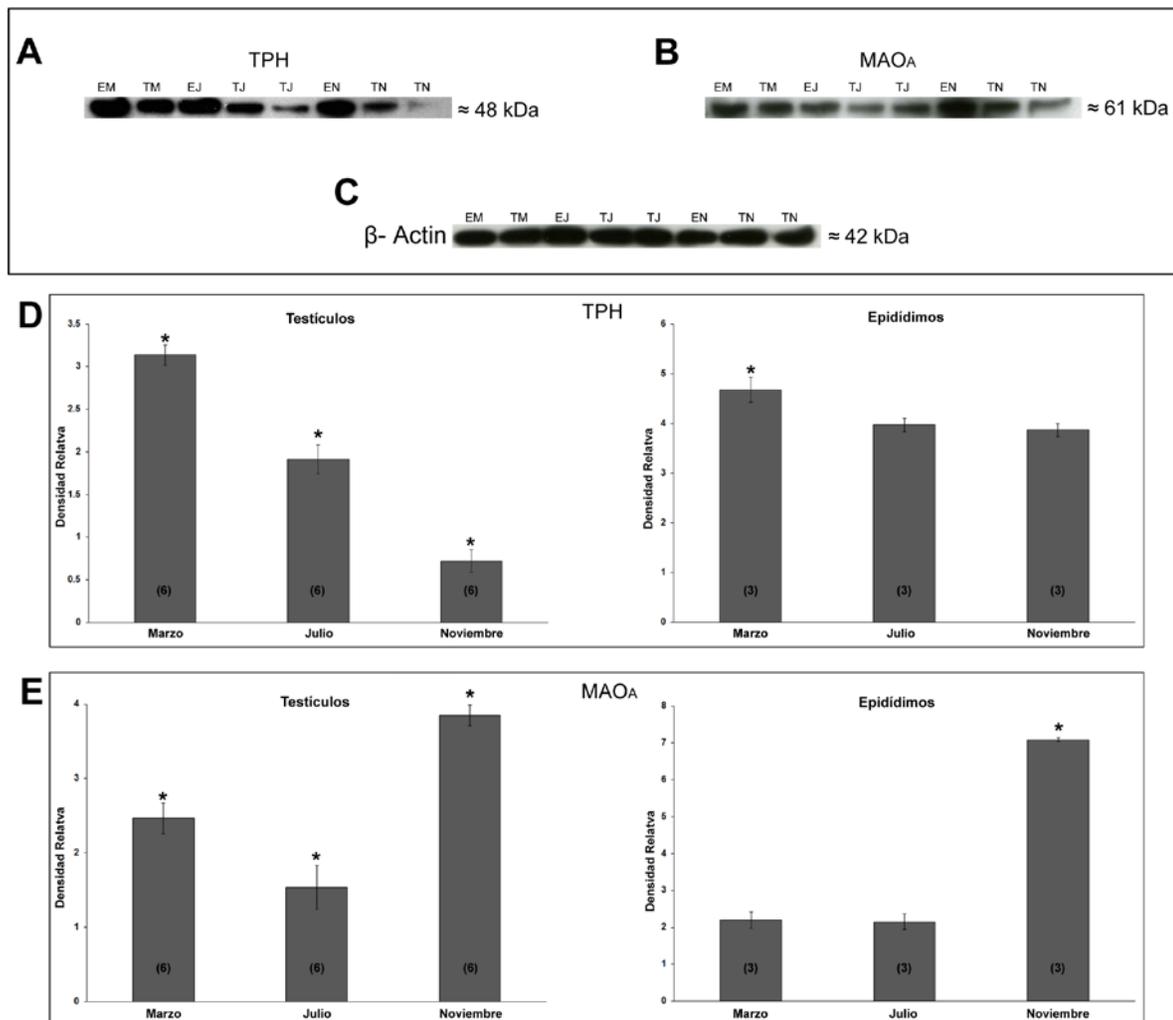


Figura 12. Bandas de proteínas correspondientes a las enzimas TPH y MAOA en **A** y **B** respectivamente de los Western Blot de testículos y epidídimos del Murciélago *Myotis velifer*. **C)** control de proteínas β -actina. **D** y **E** análisis densitométrico de la expresión de proteínas de las enzimas TPH y MAOA respectivamente. EM = epidídimo de marzo; EJ = epidídimo de julio; EN = epidídimo de noviembre; TM = testículo de marzo; TJ = testículo de julio y TN = testículo de noviembre. Las barras representan el valor promedio de órganos analizados \pm desviación estándar. En el paréntesis se indica la cantidad de testículos o epidídimos utilizados por mes para este estudio. ANDEVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey, * $p < 0.05$ entre las etapas del ciclo reproductivo.

Concentración de 5-HT en plasma sanguíneo, y en tejidos testicular y epididimario en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Myotis velifer*.

El valor promedio de 5-HT en plasma sanguíneo fue de 2.33 ng/ml \pm 0.35 ng/ml, sin presentar variaciones significativas entre las diferentes etapas del ciclo reproductivo analizadas (figura 13). En cambio, en los testículos de *M. velifer* se encontró que la concentración de 5-HT fue significativamente más elevada en las etapas de inactividad reproductiva completa (Marzo, 9.75 ng/ml \pm 0.97 ng/ml) y de inactividad de espermatogénesis (Noviembre, 8.88 ng/ml \pm 0.90 ng/ml) que la concentración en la etapa de espermatogénesis (Julio, 6.65 ng/ml \pm 0.10 ng/ml; figura 14A). El perfil de concentración de 5-HT en el epidídimo mostró una clara correspondencia respecto al perfil determinado para el testículo en las diferentes etapas del ciclo reproductivo estudiadas para el murciélago *M. velifer* (figura 14B).

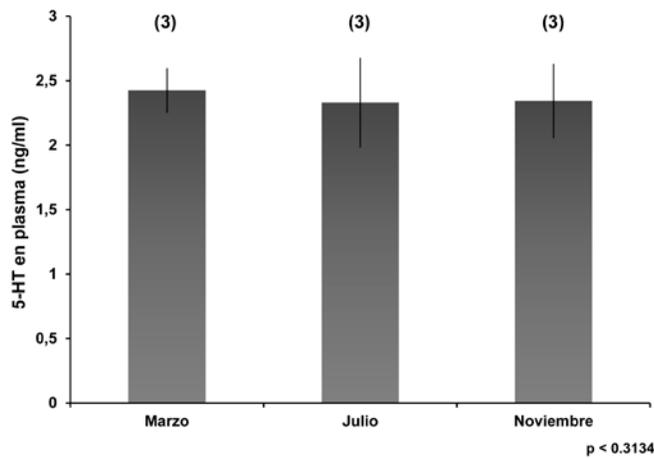


Figura 13. Comparación de los valores promedio de concentración de 5-HT en plasma sanguíneo en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Myotis velifer*. Las barras representan el valor promedio de murciélagos analizados \pm desviación estándar. En el paréntesis se indica la cantidad de murciélagos utilizados por mes para este estudio. El análisis estadístico no demuestra la existencia de diferencias significativas entre los valores de las diferentes etapas analizadas ($F= 1.323$, ANDEVA, $p < 0.05$).

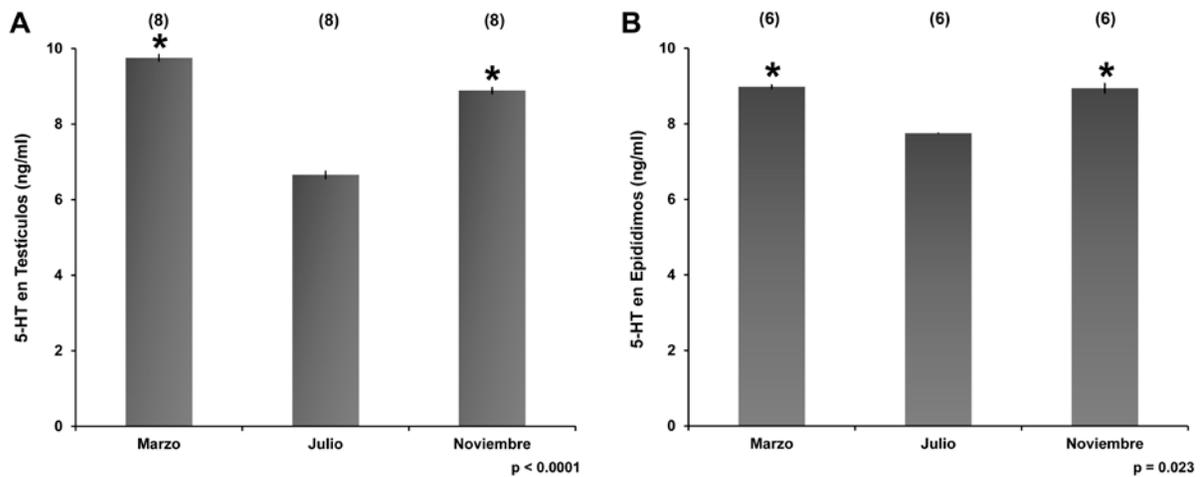


Figura 14. Comparación del valor promedio de la concentración de 5-HT obtenida para los órganos sexuales en diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Myotis velifer*. **A)** Testículo; **B)** Epidídimo. Las barras representan el valor promedio de los órganos analizados \pm desviación estándar. En el paréntesis se indica la cantidad de testículos o epidídimos utilizados por mes para este estudio; ANDEVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey * $p < 0.05$ para las diferentes etapas del ciclo reproductivo (Marzo: inactividad reproductiva completa; Julio: espermatogénesis; Noviembre: inactividad de espermatogénesis, almacenamiento epididimario de esperma y apareamiento).

Un estudio no contemplado en los objetivos de este trabajo de tesis pero del que se tuvo la oportunidad de realizar de manera complementaria, fue el estudio para la determinación de la concentración de testosterona en tejido testicular y su variación en las diferentes etapas del ciclo reproductor de la especie por el método de ELISA. Los resultados obtenidos indican que el valor más bajo de concentración de testosterona testicular se presentó en Marzo (6.25 ng/ml \pm 0.95 ng/ml) cuando los individuos se encuentran en completa inactividad sexual; mientras que un incremento significativo se registró en Julio (17 ng/ml \pm 1.15 ng/ml) en relación con la actividad de espermatogénesis. Y en Noviembre, cuando los testículos ya no muestran actividad de espermatogénesis pero se están llevando a cabo los apareamientos, la concentración de testosterona testicular disminuyó a 7.25 ng/ml \pm 2.9 ng/ml, siendo ligeramente mayor que el registrado para el periodo de inactividad reproductiva completa (figura 15).

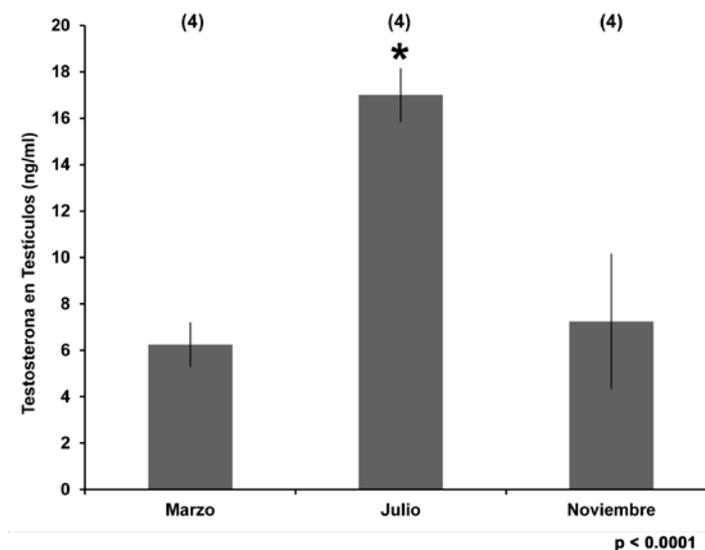


Figura 15. Comparación de los valores promedio de la concentración de testosterona en tejido testicular en las diferentes etapas del ciclo reproductivo del murciélago *Myotis velifer* (resultados preliminares). Las barras representan el valor promedio de testículos analizados \pm desviación estándar. En el paréntesis se indica la cantidad de testículos utilizados por mes para este estudio; ANDEVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey * $p < 0.05$ entre etapas del ciclo de reproducción.

DISCUSIÓN.

El amplio espectro de mamíferos tienen un ciclo de reproducción continuo durante todo el año, en tanto la actividad de las gónadas y órganos sexuales secundarias en los machos dependen de la función testicular y están regulados principalmente por la testosterona producida en células de Leydig (Tinajero *et al.*, 1993) . Sin embargo, algunas especies de mamíferos son estacionales y muestran todas las características reproductivas (conducta, cortejo y apareamiento) en un corto período de tiempo. Por lo tanto, su patrón testicular es similar a otros mamíferos, pero se limita a un periodo del año (Frungieri *et al.*, 1999; Krutzsch, 2009).

Los murciélagos entran en letargo o hibernación al final del otoño y muestran una involución de los testículos y la hipertrofia de las glándulas sexuales accesorias que permanecen activas durante todo el invierno. En el murciélago *Myotis velifer*, tanto la espermatogénesis y la actividad de las células de Leydig se inicia a finales del verano y otoño, y al final del otoño es cuando se comienzan los apareamientos (Gustafson, 1987; Krutzsch, 2000, 2009).

Con las características somáticas de testículos y epidídimos, conductuales y reproductivas del murciélago *Myotis velifer* hemos establecido un patrón reproductivo asincrónico para la colonia estudiada desde hace más de dos décadas en la sierra norte de Puebla, encontramos que los testículos comienzan su recrudescencia y el proceso de espermatogénesis en el mes de Abril, difiriendo por un mes con lo reportado por Krutzsch, (2009) para ejemplares de la misma especie estudiados en Texas-Arizona (EUA); por León-Galván, (2008) para el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, en que se tomó en cuenta el peso y la longitud del testículo, en una de las mismas localidades de nuestro estudio, conocida como el Túnel en el área limítrofe entre Puebla y Tlaxcala, y con lo reportado para el murciélago *Myotis lucifugus* (Gustafson, 1979), que comienzan este proceso a partir de Mayo.

Myotis velifer alcanza su máximo tamaño testicular en Junio, que presenta mayor semejanza con lo reportado para *M. lucifugus* quien lo alcanza a finales de Julio, y difiere bastante con lo reportado para *C. mexicanus* y para la colonia de *M. velifer* en Texas-Arizona, que alcanzan su máximo tamaño testicular para Agosto y Septiembre respectivamente; esto puede estar dado por sus hábitos de hibernación; para el primer caso tenemos un murciélago que pasa por un proceso de torpor diario que le permite buscar agua y alimento, a diferencia de *M. velifer* que es un hibernante que tiene que hacer uso de sus reservas de grasa; la diferencia de tres meses que encontramos entre la colonia de la sierra norte de Puebla y la colonia reportada por Krutzsch, (2009), para Texas-Arizona está dada por las condiciones climáticas que se dan entre las dos regiones de estudio al estar en latitudes diferentes; en cuanto a la involución testicular para las tres especies mencionadas se comportan de la misma manera, dándose durante el otoño, invierno y parte de la primavera.

En el caso de los epidídimos de *M. velifer* encontramos que su ciclo anual se comporta de la misma manera que los murciélagos de Texas-Arizona reportados por Krutzsch, (2009) y para *C. mexicanus* (Leon-Galvan, 2008), difiriendo solamente en el mes en el que alcanzan su máxima longitud, Octubre y Septiembre respectivamente, pero coincidiendo plenamente con el murciélago *M. lucifugus* (Gustafson, 1979), que alcanza su máxima longitud en el mes de Agosto.

También podemos mencionar que los machos de *M. velifer* realizan desplazamientos altitudinales para realizar sus diferentes actividades reproductivas ya que en las tres localidades de captura presentaron diferente desarrollo de sus órganos reproductores (testículos y epidídimos); (Arratia, 2000; López-Wilchis, y León-Galván datos no publicados), indicándonos que buscan los refugios con las condiciones climáticas y de disponibilidad de alimento más adecuados, buscando su sobrevivencia.

Para entender mejor como es el comportamiento de las actividades reproductivas de los murciélagos hibernantes con ciclos estacionales asincrónicos en este estudio hicimos una descripción por primera vez de la presencia de serotonina (5-HT) en los testículos y epidídimos en tres principales etapas del ciclo reproductivo de *M. velifer*.

En los testículos de los mamíferos, 5-HT se encuentra comúnmente en las células de Leydig en la zona intersticial, mastocitos situado en la cápsula testicular, y en el flujo sanguíneo testicular (Tinajero *et al.*, 1993; Collin *et al.*, 1996; Frungieri *et al.*, 1999).

Campos *et al.* (1990) Informó que una cantidad apreciable de 5-HT testicular podría ser derivado de una inervación serotoninérgica de las gónadas, principalmente de la inervación capsular, debido a que la denervación específica del nervio espermático superior produce una disminución significativa en el contenido de 5-HT capsular y líquido intersticial (34 %).

Debido a que la 5-HT se almacena en densas vesículas del núcleo en el citoplasma de algunas neuronas, principalmente en células de la cabeza del epidídimo y células de Leydig en roedores, decidimos utilizar los métodos de Falck - Hillarp y de inmunofluorescencia para la búsqueda de esta indolamina en los testículos de estos murciélagos. Estas técnicas son relativamente simples, altamente sensibles y específicas para la localización de monoaminas, tales como 5-HT a nivel celular (Klemm, 1982; Hökfelt, 2010).

En el presente trabajo se encontró un patrón de expresión similar de 5-HT con ambas técnicas a lo largo de todas las etapas del ciclo anual testicular del murciélago. Nosotros encontramos que la 5-HT está presente en el interior de las células de Leydig en todas las etapas del ciclo de los testículos, y postulamos que probablemente actúa como modulador de la síntesis de testosterona como lo hace en el hámster dorado y la rata (Frungieri *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2012).

Especies en donde se ha reportado que concentraciones altas de 5-HT tienen una función inhibitoria gonadal en la producción de testosterona, indicándonos que en *M. velifer* existen las fases de recrudescencia e involución moduladas por 5-HT.

No excluimos la posibilidad de que algunas de las marcas positivas encontradas podrían ser células endoteliales o mastocitos (Frungeri *et al.*, 1999; Jiménez-Trejo *et al.*, 2007), pero el patrón de distribución y la forma de las células que encontramos fueron principalmente los propios de las células de Leydig, localizadas exclusivamente en el intersticio testicular (de Kretser y Kerr, 1988). No encontramos mastocitos positivos a 5-HT en la región intersticial testicular, tal como se ha descrito en otros reportes, nosotros sugerimos que probablemente las células de mastocitos en los testículos de los murciélagos se encuentran en la cápsula testicular alrededor de los vasos sanguíneos, como se ha reportado en roedores (Campos *et al.*, 1990).

En algunos mamíferos a nivel cerebral como la ardilla de tierra *Citellus erythrogegens* (Popova y Voitenko, 1981), el hámster dorado *Mesocricetus auratus* (Novotná *et al.*, 1975) y en el murciélago *Myotis lucifugus* (Nunez *et al.*, 1981; Bauman *et al.*, 1989), encontraron que hay una fluctuación estacional de la concentración de 5-HT que aumenta justo antes de entrar en hibernación o durante esta, con un descenso de la concentración al salir de la hibernación al instante de darse la excitación, nosotros encontramos que a nivel testicular en el murciélago *M. velifer* sucede algo similar; permitiendo que el aumento de concentración de 5-HT previo a la hibernación, inhiba la secreción de testosterona y se dé la involución testicular y que al terminar la hibernación con la disminución de 5-HT se active la recrudescencia testicular y por consiguiente la espermatogénesis. Por lo que podemos pensar que al igual que en el murciélago *M. lucifugus*, el aumento o disminución de la concentración de 5-HT en el testículo puede ser la señal que le indica en que momento inicia o termina el proceso de hibernación, junto con las señales que se dan a nivel central (Nunez *et al.*, 1981).

La expresión de 5-HT en la etapa de noviembre durante la involución testicular, se mostró en células de Sertoli y al parecer en espermatogonias en diferentes túbulos seminíferos (Jiménez-Trejo et al., en preparación). En este mes se inicia la ventana de tiempo en que se transportan los espermatozoides desde los testículos al epidídimo para su posterior maduración y almacenamiento, es probable que la 5-HT podría participar en dicho proceso, sin embargo, reconocemos que más profundos y diversos experimentos son necesarios para validar esta idea. Sin embargo, nuestros resultados apoyan firmemente el hecho de que la 5-HT está presente en el testículo de murciélagos, ampliando la previa idea propuesta de que la 5-HT es un modulador de la maduración de los espermatozoides y procesos de fecundación en mamíferos (Jiménez-Trejo *et al.*, 2007, 2012 ; Fujinoki, 2011).

También encontramos que ambas enzimas TPH y MAO_A muestran una variación en su expresión en testículos y epidídimos del murciélago *M. velifer* a lo largo del ciclo. La expresión de MAO_A incrementa su expresión al inicio de la fase de hibernación, mientras que la TPH encuentra su fase más alta durante el final de la fase de hibernación, y serotonina en ambas fases histológicamente ésta presente aparentemente iniciando un aumento en su presencia y localización.

Es tentador postular que la testosterona y la 5-HT forman un mecanismo de encendido/apagado para el proceso de la espermatogénesis en los testículos de los murciélagos de *M. velifer*. En apoyo de esta idea, se ha informado que la 5-HT en coordinación con el factor liberador de corticotropina (CRF) regula negativamente la síntesis de testosterona de una manera autocrina a través de los receptores 5HT₂ (Campos *et al.*, 1990; Tinajero *et al.*, 1993). Sin embargo, se deben realizar otros experimentos que permitan confirmar esta idea.

Un papel adicional para la actividad de MAO_A ha sido descrito en testículos de la rata (Ellis *et al.*, 1972); porque MAO_A es una enzima mitocondrial que cataliza 5-HT y otras aminas biogénicas y esta actividad genera biomoléculas que promueve las respuestas celulares en los demás tejidos reproductivos tales como la próstata y glándulas sexuales accesorias, es probable que la actividad de MAO_A en los testículos y epidídimos pueden contribuir al ciclo testicular, epididimal y glandular también de esta manera (Pichardo *et al.*, 2011; White *et al.*, 2012).

En la cuantificación de los niveles de 5-HT durante las tres etapas de estudio no encontramos diferencias significativas en sangre que mostrarán diferencias entre ellos, probablemente porque la 5-HT no circula libremente en cantidades significativas (Gershon y Tamir, 1984), estos niveles no muestran una variación entre etapas ya que son el reflejo de que la 5-HT se sintetiza localmente en diferentes órganos por ejemplo en las células enterocromafines del intestino, incorporándose activamente en las plaquetas para ser distribuidas en todo el cuerpo como una hormona (Amireault *et al.*, 2012).

En testículos y epidídimos se presentó un patrón interesante en el que los niveles más altos de 5-HT se presentan en las etapas de inactividad reproductiva y en los testículos en etapa de involución y para la etapa de espermatogénesis se mostró una disminución significativa de estos niveles coincidiendo plenamente con lo reportado en hámster (Frungieri *et al.*, 1999), en relación a la producción de testosterona que permite que se active o se inhiba el proceso de espermatogénesis y porque adicionalmente cuantificamos la testosterona por medio de ELISA en los testículos del murciélago *M. velifer* a lo largo del ciclo testicular observamos que estas variaciones nos permiten confirmar que se tiene una relación inversamente proporcional entre la 5-HT y la testosterona.

Relación que nos permite sugerir en este trabajo que esta tiene una función local regulatoria de la síntesis y función de la testosterona en el testículo por lo que la 5-HT pudiera modular directamente los procesos de espermatogénesis e involución testicular actuando como un reloj biológico en esta especie de murciélago estacional. Sin embargo más estudios se requieren para comprobar estas ideas.

CONCLUSIONES

- 1) Los resultados del presente trabajo sugieren la presencia y localización de 5-HT en las células de Leydig, y de las enzimas TPH y MAOA en testículos y epidídimos de *M. velifer*, y su expresión varía en las diferentes etapas reproductivas de la especie.
- 2) La 5-HT se relaciona inversamente con la testosterona, lo que podría estar determinando la participación de esta neurohormona en la regulación del patrón reproductivo masculino temporalmente asincrónico de esta especie de murciélago, y la presencia de las enzimas del ciclo de la serotonina TPH y MAO_A en los tejidos testiculares llevan a cabo el metabolismo de esta indolamina, además de la que puede venir de la circulación.

LITERATURA CITADA

- Allen J. A. 1890. Notes on collections of mammals made in central and southern Mexico, by Dr. Audley C. Buller, with descriptions of new species of the genera *Vespertilio*, *Sciurus*, and *Lepus*. Bull Amer Mus Nat Hist. 3:175-194.
- Amireault P., Sibon D., and Côté F. 2012. Life without peripheral serotonin: insights from Tryptophan Hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. ASC Chem Neurosci. 4(1):64-71.
- Anthony E. L. P. 1988. Age Determination in Bats. In: H. T. Kunz, editor. Ecological and Behavior Methods for the Study of Bats. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. pp. 47-58.
- Aragón M. A., Ayala M. E., Marín M., Avilés A., Damián-Matsumura P., and Domínguez R. 2005. Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. Reproduction. 129: 717–727.
- Arratia G. S. 2000. Algunos aspectos básicos de la biología de *Myotis velifer velifer* (Chiroptera: Vespertilionidae) durante un ciclo anual en los estados de Puebla y Tlaxcala. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UAEM. México. 86 pp.
- Bauman W. A., Hashim A., and Sershen H. 1989. Cerebral cortical concentrations of bioamines and their metabolites during arousal and after feeding in the little brown bat (*Myotis lucifugus*). Brain Res. 500;156-160.
- Berumen L. C., Rodríguez A., Miledi L., and García-Alcocer G. 2012. Serotonin Receptors in Hippocampus. ScientificWorldJournal. 2012: 1-15.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Bronson F. H. 1989. Mammalian reproductive biology. USA. pp.325
- Campos M. B., Vitale M. L., Calandra R.S., and Chiochio S. R. 1990. Serotonergic innervation of the rat testis. J Reprod Fertil. 88:465-479.
- Collin O, Damber J. E., and Bergh A. 1996. 5-Hydroxytryptamine a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. J Reprod Fertil. 106:17–22.

Costall B., and Naylor R. J. 2004. 5-HT₃ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3:27-37.

Crichton E., and Krutzsch P. 2000. *Reproductive Biology of Bats.* Academic Press. 426 p.

Csaba Z. S., Csernus V., and Gerendai I. 1998. Intratesticular Serotonin Affects Steroidogenesis in the Rat Testis. *J Neuroendocrinol.* 10:371–376.

de Kretser D. M., and Kerr J. B. 1988. The cytology of the testis. In: Knobil E., Neill J. D., editors. *Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press. pp. 999-1080.

Dufau M. L., Tinajero J. C., and Fabbri A. 1993. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J.* 7:299–307.

Ellis L. C., Jaussi A. W., Baptista M. W., and Urry R. L. 1972. Correlation of age changes in monoamine oxidase activity and androgen synthesis by rat testicular minced and teased preparation in vitro. *Endocrinology.* 90:1610-8.

Erickson J. D., Schafer M. K., Bonner T. I., Eiden L. E., and Weihe E. 1996. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci.* 93(10):5166–5171.

Fidalgo S., Ivanov D. K., and Wood S. H. 2012. Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology.* DOI 10.1007/s10522-012-9406-3.

Filip M., and Bader M. 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep.* 61(5):761–777.

Fitch H., Shump A. S., and Shump U. 1981. *Myotis velifer.* *Mamm Spec.* 149:1-5.

Frungieri M. B., Gonzalez-Calvar S. I., and Calandra R. S. 1996. Polyamine levels in testes and seminal vesicles from adult golden hamsters during gonadal regression-recrudescence. *J Androl.* 17:683-691.

Frungieri M. B., Gonzalez-Calvar S. I., Rubio M., Ozu M., Lustig L., and Calandra R. S. 1999. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology.* 69:299-308.

Frungieri M. B., Mayerhofer A., Zitta K., Pignataro O. P., Calandra R. S., and Gonzalez-Calvar S. I. 2005. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin - releasing hormone system. *Endocrinology*. 146:1541-52.

Fujinoki M. 2011. Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction*. 142:255–266.

Fuller R. W., and Wong D. T. 1990. Serotonin uptake and serotonin uptake inhibition. *Ann N Y Acad Sci*. 600:68–80.

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

Gaspar P., Cases O., and Maroteaux L. 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*. 4:1002-1012.

Gershon M. D. 2004. Review article: serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther*. 20(Suppl 7):3-14.

Gershon, M. D., and Tamir H. 1984. Serotonectin and the family of proteins that bind serotonin. *Biochem Pharmacol*. 36:3115-3118.

Gustafson A. W. 1979. Male Reproductive Patterns in Hibernating Bats. *J. Reprod. Fert*. 56:317-331.

Gustafson A. W. 1987. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular cycle of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*: histology and lipid histochemistry. *Am J Anat*. 178:312 -325.

Hayward B. J. 1970. The natural history of the cave bat, *Myotis velifer*. *Western New Mexico. Univ Res Sci*. 1: 1-74.

Hökfelt T. 2010. Looking at neurotransmitters in the microscope. *Progr Neurobiol*. 90:101-18.

Hoyer D., Hannon J. P., and Martin G. R. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 71:533-554.

Hurley L. M., and Thompson M. 2001. Serotonergic innervation of the auditory brainstem of the Mexican free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*. J Comp Neurol. 435: 78-88.

Iceta-Echave R. 2008. Caracterización del transportador de serotonina humano en células caco-2: estudio de los mecanismos de regulación fisiológica. Tesis doctoral. Facultad de Farmacología y Fisiología, Unidad de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. 255 p.

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

Jiménez-Trejo F., Tapia-Rodríguez M. T., Cervantes M. C., Kuhn D. M., Gutiérrez G. M., Mendoza-Rodríguez C. A., and Picazo O. 2012. Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. Reproduction. 144:1-10. DOI: 10.1530/REP-12-0145.

Jiménez-Trejo F., León-Galván M. A., Martínez-Méndez L. A., Tapia-Rodríguez M. T., Mendoza-Rodríguez C. A., González-Santoyo I., López-Wilchis R., Vela-Hinojosa C., Baranda-Avila N., and Cerbon M. 2013. Serotonin in testes of bat *Myotis velifer* during annual reproductive cycle: expression, localization, and content variations. J Exp Zool. 9999:1-10.

Kawai M., and Rosen C. J. 2010. Minireview: a skeleton in serotonin's closet? Endocrinology. 151(9):4103–4108.

Kawamoto K. 2003. Endocrine control of the reproductive activity in hibernating bats. Zoolog Sci. 20: 1057-1069.

Klemm N. 1982. A Modified glyoxylic acid-formaldehyde technique for histofluorescence of catecholamine-containing neurons in cryostat sections of the insect brain. J Histochem Cytochem. 230:398-400.

- Krutzsch P. H. 2000. Anatomy physiology and cyclicity of the male reproductive tract. In: Crichton E. G., Krutzsch P. H., editors. Reproductive biology of bats. London: Academic Press. pp. 1-155.
- Krutzsch P. H. 2009. The reproductive biology of the cave Myotis (*Myotis velifer*). Acta Chiropterol. 11(1): 89-104.
- Kunz T. H. 1973. Population studies of the cave bat (*Myotis velifer*): reproduction, growth, and development. Occ Pap Mus Nat Hist Univ Kans. 15:1-43.
- Kunz T. H. 1982. Roosting ecology, in Ecology of bats. Kunz T. H. (ed.) Plenum Press, New York. pp. 1-56.
- Kus L., Akpolat N., Özen O. A., Songur A., Kavakli A., and Sarsilmaz M. 2002. Effects of melatonin on Leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. Acta Histochem. 104(1): 93–97.
- Dell L. A., Kruger J. L., Bhagwandin A., Jillani N. E., Pettigrew J. D., and Manger P. R. 2010. Nuclear organization of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic systems in the brains of two megachiropteran species. J Chem Neuroanat. 40: 177-195.
- León-Galván M. A. 2008. Participación de la muerte celular por apoptosis durante la espermatogénesis en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). Tesis Doctoral UAMI. 95 p.
- León-Galván M. A., López-Wilchis R., Hernández-Pérez O., Arenas-Ríos E., and Rosado A. 2005. Male reproductive cycle of Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). The southwestern naturalist. 50(4):453-460.
- Lindvall O., and Björklund A. 1974. The Glyoxylic Acid Fluorescence Histochemical Method: a Detailed Account of the Methodology for the Visualization of Central Catecholamine Neurons. Histochemistry. 39:97-127.
- Lychkova A. E., and Potapova V. B. 2006. Effect of Serotonin on Gonadal Function. Bull Exp Biol Med. 142:378-383.
- Malpaux B. 2006. Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In: Physiology of Reproduction. Knobil and Neill's editors. Academic Press. London. pp. 2231-282.

- Maseko B. C., and Manger P. R. 2007. Distribution and morphology of cholinergic, catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of Schreiber's long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii*. *J Chem Neuroanat.* 34:80-94.
- Maseko B. C., Bourne J. A., and Manger P. R. 2007. Distribution and morphology of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of the Egyptian rousette flying fox, *Rousettus aegyptiacus*. *J Chem Neuroanat.* 34:108-127.
- Marston O. J., Garfield A. S., and Heisler L. K. 2011. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *Eur J Pharmacol.* 660(1):70–79.
- Morgan P. J., and Mercer J. G. 1994. Control of seasonality by melatonin. *Proc Nutr Soc.* 53:483-493.
- Novotná R., Janský L., and Drahotka Z. 1975. Effect of hibernation on serotonin metabolism in the brain stem of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Gen Pharmac.* 6:23-26.
- Nunez E. A., Gershon M. D., and Silverman A. J. 1981. Uptake of 5-hydroxytryptamine by gonadotrophs of the bat's pituitary: A combined immunocytochemical radioautographic analysis. *J Histochem Cytochem.* 29:1336-1346.
- Payette R., Gershon M. D., and Nunez E. A. 1986. Colocalization of luteinizing hormone and serotonin in secretory granules of mammalian gonadotrophs. *Anat Rec.* 215:51-58.
- Peroutka S. J., and Howell T. A. 1994. The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology.* 33:319-324.
- Pichardo A. I., Tlachi-López J., Jiménez-Trejo F., Fuentes-Farías A., Baez-Saldaña A., Molina-Cerón M., Manjarrez-Gutierrez G., Gutiérrez-Ospina G., and Lucio A. 2011. Increased serotonin concentration and tryptophan hydroxylase activity in reproductive organs of copulator males: a case of adaptive plasticity. *Adv Biosc Biotech.* 2(2):75-84.
- Popova N. K., and Voitenko N. N. 1981. Brain serotonin metabolism in hibernation. *Pharmacol Biochem Behav.* 14:773-777.

- Racey P. A. 1974. The reproductive cycle in male noctule bats, *Nyctalus noctula*. *J Reprod Fertil.* 41:169-82.
- Rapport M. M., Green A. A., and Page I. H. 1948. Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 176:1243–1251.
- Rossi S. P., Matzkin M. E., Terradas C., Ponzio R., Puigdomenech E., Levalle O., Calandra R. S., and Frungieri M. B. 2012. New insights into melatonin/CRH signaling in hamster Leydig cells. *Gen Comp Endocrinol.* 178:153-63.
- Sanford L. M., and Baker S. J. 2010. Prolactin regulation of testosterone secretion and testes growth in DLS rams at the onset of seasonal testicular recrudescence. *Reproduction.* 139: 197-207.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, Ciudad de México, Diciembre 30.
- Shishkina G. T., and Borodin P. M. 1989. Involvement of brain serotonin in regulation of sexual maturity in male rats. *Neurosci Behav Physiol.* 74:118-23.
- Shishkina G. T., and Dygalo N, N. 2000. Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 125:45–51.
- Siegel G. J., Brady S., and Albers R. W. 2011. Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology. Elsevier Publishing, Amsterdam. ISBN 0123749476.
- Sokal R. R., and Rohlf F. J. 1995. Biometry. W. H. Freeman and Co., N.Y. 887 p.
- Syed V., Gomez E., and Hecht N. B. 1999. Messenger ribonucleic acids encoding a serotonin receptor and a novel gene are induced in sertoli cells by a secreted factor(s) from male rat meiotic germ cells. *Endocrinology.* 140(12):5754-5760.

- Tijmes M., Pedraza R., and Valladares L. 1996. Melatonin in the rat testis: Evidence for local synthesis. *Steroids*. 61:65-68.
- Tinajero J. C., Fabbri A., Ciocca D. R., and Dufau M. L. 1993. Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology*. 133:3026-3029.
- Turek F. W., Desjardins C., and Menaker M. 1976. Differential Effects of Melatonin on the Testes of Photoperiodic and Nonphotoperiodic Rodents. *Biol Reprod*. 15:94-97.
- Vanhoutte P. M. 1985. Serotonin and the cardiovascular system. Raven Press, New York. pp. 288.
- White T. A., Kwon E. M., Fu R., Lucas J., Ostrander E. A., Stanford J. L., and Nelson P. S. 2012. The monoamine oxidase a gene promoter repeat and prostate cancer risk. *Prostate*. 72:1622-1627.
- Wimsatt W. A. 1960. Some problems of reproduction in relation to hibernation in bats. *Bull Mus Comp Zool*. 124: 249-267.
- Wimsatt W. A. 1969. Some interrelations of reproduction and hibernation in mammals, In *Dormancy and survival*, H. W. Woolhouse editors. Academic Press. New York. pp. 511-549.
- Yoshida M., Nagatsu I., Kondo Y., Karasawa N., Spatz M., and Nagatsu T. 1982. Immunohistochemical localization of catecholamine-synthesizing enzymes and serotonin in the bat brain. *Acta Histochem Cytochem*. 15:116-128.
- Young K. A., and Nelson R. J. 2001. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction*. 122:677-685.

ANEXO I

Listado de reactivos.

Sigma-aldrich®

Poli-l-lisina	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Paraformaldehido	NP-40 (Nonilfenoxi polietoxietanol)
Hoechst 33258	Albumina sérica de bovino
Citrato de sodio tribásico dihidratado	

J.T.Baker® Chemicals

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	Etanol
Fosfato de sodio bibásico (Na_2HPO_4)	Glicerol
Cloruro de sodio (NaCl)	2-Hydroxyethyl mercaptan β - Mercaptoethanol
Cloruro de potasio (KCl)	Dodesilsulfato Sodico (SDS)
Ácido clorhídrico	Metanol

Akema Fine Chemical

Ácido glioxílico (glyoxylic acid 50).

Dako Denmark A/S

Medio de Montaje Fluorescente, DAKO, DakoCytomation.

GeneTex Inc

Mouse monoclonal anti (5-HT-H209).

Merck Millipore Corporation

Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Desoxicolato de sodio
Rhodamine conjugate. Éter dietílico

Bio-Rad Laboratories, Inc

Triton X-100 Detergent #161-0407 Bromophenol blue
30% Acrylamide/Bis Solution #161-0154 SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine) Tween 20 #170-6531
#161-0801 Glicina

Amresco®

Persulfato de Amonio (PSA)

Thermo Fisher Scientific Inc

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate

ALPCO® Diagnostics

Serotonin Research ELISA (17-SERHU-E01-RES)

ANEXO II

Preparación de Soluciones

Preparación de Laminillas con Poli-L-lisina.

Se colocan las laminillas previamente lavadas en una caja coplin horizontal con Poli-L-lisina (1mg/ml), en incubación y agitación durante 1 hr; lavar las laminillas con abundante agua destilada (5 lavados de 10 minutos o más); aclarar las laminillas con etanol absoluto y ponerlas a secar.

Buffer de lisis RIPA.

NP-40 (Nonilfenoxi polietoxietanol) 1% v/v	0.5 ml
Desoxicolato de sodio 0.5%	0.5 ml al 5%
SDS 0.1%	0.5 ml al 10%
Inhibidor de proteasas	1 pastilla
Mezclar todo y aforar a 50 ml con PBS 1X	

Buffer de Glicina-HCl pH 2.2.

A: Glicina 0.2 M y

Se disuelven 15.01 g de glicina en 800 ml de H₂O destilada y se afora a 1 L.

B: HCl 0.2 M

Se diluyen 1.546 ml de HCl en 250 ml de H₂O destilada.

Se mezclan 50 ml de **A** en 11.4 ml de **B** y se afora a 200 ml con H₂O destilada.

Histoquímica e Inmunofluorescencia.

Paraformaldehído al 1% para 100 ml.

Se disuelve 1g de paraformaldehído en 100 ml de H₂O destilada calentando a 60 °C.

Ácido Glioxílico al 8% para 10 ml.

Se toma 1.6 ml de ácido glioxílico al 50% y diluir en 8.4 ml de PBS.

PBS 1X para 1 L pH 7.4.

Se mezclan en 800 ml de H₂O destilada.

Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 0.24 g

Fosfato de sodio bibásico (Na₂HPO₄) 1.44 g

Cloruro de sodio (NaCl) 8.0 g

Cloruro de potasio (KCl) 0.2 g

Se Afora a 1 L y se ajusta el pH

Citrato de Sodio pH 6.0 para 1 L.

Se Disuelven 2.94 g de citrato de sodio tribásico dihidratado en 1 L de H₂O destilada.

Nota: se debe de calentar aproximadamente a unos 40 °C antes de usarse.

Suero de Bloqueo 3% pH 7.0.

Se Disuelven 0.3 g de Albumina sérica de bovino en 10 ml de PBS y se agregan 10 µL de Triton.

Protocolo para preparar dos geles para Western Blot.

Tris 1.0 M pH 6.8.

6.05 g de Tris base en 50 ml de H₂O destilada.

Nota. El pH se ajusta con HCl puro.

Tris 1.5 M pH 8.8.

8.0 g de Tris base en 50 ml de H₂O destilada.

Nota. El pH se ajusta con HCl puro

Gel de resolución 10% para 20 ml.

Se mezclan los siguientes reactivos:

H ₂ O destilada	7.8 ml
30% Acrilamida/bis	6.7 ml.
1.5 M Tris (pH 8.8)	5.0 ml.
10% Dodesilsulfato Sodico (SDS)	0.2 ml.
10% Persulfato de Amonio (PSA)	0.2 ml.
TEMED	0.01 ml.

Gel stacking 5% para 10 ml.

Se mezclan los siguientes reactivos:

H ₂ O destilada	6.7 ml
30% Acrilamida/bis	1.7 ml.
1.0 M Tris (pH 6.8)	1.2 ml.
10% Dodesilsulfato Sodico (SDS)	0.1 ml.
10% Persulfato de Amonio (PSA)	0.1 ml.
TEMED	0.011 ml.

Nota: el TEMED se agrega justo antes de cargar el gel en los cristales del kit de Western Blot (Bio-Rad Laboratories, Inc.) hasta una altura de 2.5 o 3 cm antes de llegar al borde y esperar a que polimerice.

Buffer de Carga para Western Blot 2X.

Se mezclan estos reactivos para un volumen de 8 ml.

0.5 mM Tris-HCl pH 6.8	1 ml
10 % SDS	1.6 ml
1 % Bromophenol blue	0.08 ml
20 % glicerol	2 ml
H ₂ O destilada	2.92 ml

Almacenar pequeñas alícuotas a -20 °C y agregar 0.4 ml de β-mercaptoetanol antes de usarse.

Buffer de corrida 1X de western blot para 1L.

Se mezclan en 700 ml de H₂O destilada:

Tris base	3.0 g
Glicina	1.44 g
SDS	1.0 g

Se afora a 1 L con H₂O destilada.

Suero de Bloqueo 10 % para Western Blot.

Se disuelven 3 g de leche descremada más 0.3 g de albumina sérica de bovino en 30 ml de TBS.

TBS Tween para 1 L.

Se agregan 500 µL de Tween-20 en 1 L de TBS y se ajusta el pH a 7.4.

Stock de Buffer de transferencia 10X de western blot para 1L.

Se mezclan en 700 ml de H₂O destilada:

Tris base	29 g
Glicina	14.8 g
SDS	1.85 g

Se afora a 1 L con H₂O destilada.

Buffer de transferencia 1X de western blot para 1L.

70 % Agua destilada	700 ml
20 % Metanol absoluto	200 ml
10 % Buffer de transferencia 10x	100 ml

TBS 5X para 1 L.

Cloruro de sodio (NaCl)	50 g
Cloruro de potasio (KCl)	2 g
Tris base	30 g

Aforar a 1L con H₂O destilada.

ANEXO III

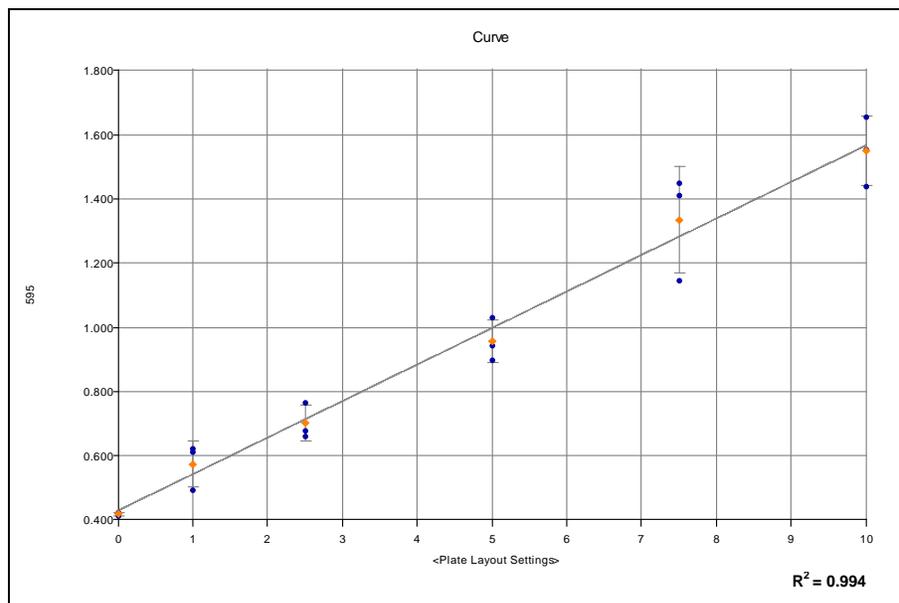
Preparación de la curva estándar por el método de Bradford.

Estándares (0.5mg/μL)	Bradford (μL)	H ₂ O destilada (μL)	Albumina/RIPA (1 mg/mol) (μL)
0	200	10	0
10	200	9	1
25	200	7.5	2.5
50	200	5	5
75	200	2.5	7.5
100	200	0	10

Nota. La cuantificación los estándares se hacen por triplicado.

El Bradford se diluye en agua destilada en 1:5 V/V.

Grafico en el que se muestra una curva estándar por el método de Bradford, medida con el espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek® Instruments, USA), y con ayuda del software Gen 5.



Serotonin in Testes of Bat *Myotis velifer* During Annual Reproductive Cycle: Expression, Localization, and Content Variations



FRANCISCO JIMÉNEZ-TREJO^{1*},
MIGUEL ÁNGEL LEÓN-GALVÁN²,
LUIS ANTONIO MARTÍNEZ-MÉNDEZ²,
MIGUEL TAPIA-RODRÍGUEZ³,
C. ADRIANA MENDOZA-RODRÍGUEZ¹,
ISAAC GONZÁLEZ-SANTOYO¹, RICARDO LÓPEZ-WILCHIS²,
CRISTIÁN VELA-HINOJOSA², NOEMI BARANDA-AVILA⁴,
AND MARCO CERBÓN¹

¹Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., Mexico

²Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos, Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F., Mexico

³Unidad de Microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., Mexico

⁴Instituto Nacional de Cancerología, México, D.F., Mexico

ABSTRACT

The mechanism of reproduction in mammals is very complex and in some cases is quite particular. For example in some bat species, the male presents a reproductive mechanism characterized by an annual testicular cycle that goes from recrudescence to regression (spermatogenesis to inactivity period, respectively). After recrudescence, the spermatozoa arrive at epididymis and wait to be expelled at the time of ejaculation during the mating period, which occurs some months later. Because serotonin (5-HT) has gained reproductive importance in the last years, the aim of the present study was to analyze the expression of this indolamine and both tryptophan hydroxylase and monoamine oxidase isoform A—enzymes involved in its metabolism—in *Myotis velifer* testes, a seasonal reproductive bat species that shows temporal asynchrony in its sexual cycle, across the principal periods of their reproductive cycle. By using both Falck–Hillarp histochemistry and immunofluorescence techniques, we found serotonin in vesicles of Leydig cells and probably Sertoli cells too; interestingly, both intracellular localization and concentration was variable across the different stages of the reproductive cycle, being lower during spermatogenesis phase and increasing during the mating phase. These results suggest that 5-HT is present in bat testes and it could play an important role in testicular function during their reproductive cycle. *J. Exp. Zool.* 9999A:1–10, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

How to cite this article: Jiménez-Trejo F, Ángel León-Galván M, Antonio Martínez-Méndez L, Tapia-Rodríguez M, Mendoza-Rodríguez CA, González-Santoyo I, López-Wilchis R, Vela-Hinojosa C, Baranda-Avila N, Cerbón M. 2013. Serotonin in testes of bat *Myotis velifer* during annual reproductive cycle: Expression, localization, and content variations. *J. Exp. Zool.* 9999:1–10.

J. Exp. Zool.
9999A:1–10, 2013

The reproduction is a complex process that involves many factors such as food availability, social and sexual behavior and environmental conditions in the habitat of species, which are essential to modulate many reproductive processes (seasonal or all year long) to ensure the perpetuation of species (Bronson, '85).

In some mammals, males show an important temporal asynchrony in the development and function of reproductive organs along the year (Frungieri et al., '99; Krutzsch, 2000; León-Galván et al., 2005). Bats are the only flying mammals and some of them show seasonal reproduction; both *Corynorhinus mexicanus* and *Myotis velifer*, members of the Vespertilionidae family, are present in Mexico and show this feature. These bat species present a testicular annual cycle that goes from recrudescence to regression (spermatogenesis to inactivity period, respectively), and these extend for some months during the year (Racey, '74; Fitch et al., '81; León-Galván et al., '99).

In the case of *M. velifer*, the biochemical and neuroendocrinological processes that participate in the recrudescence and regression cycle in testes represent a very interesting model to study this phenomenon (León-Galván et al., 2005; Arenas-Ríos et al., 2007).

It has been reported that during the sexual regression period, a significant reduction in the size of the testes, along with spermatogenesis arrest, occurs (Arenas-Ríos et al., 2007; Krutzsch, 2009). Interestingly, in seasonal species, the testes involution phenomenon leads to the adult gonad to show a regression period similar to the immature stages (i.e., seminiferous tubules without spermatogenic activity, no lumen and thin). However, during the recrudescence period, bats perform a continuous testicular sexual activity (increased testes size with active spermatogenesis and sperms located inside lumen) and Leydig cells increases testosterone synthesis as occurs in hamster (Sinha-Hikim et al., '88; Frungieri et al., '99).

The *M. velifer* male shows spermatogenic activity mainly in July and August. At that period Leydig cells increase both its size and number, and testosterone synthesis and spermatogenesis begins with the differentiation of spermatogonial cells (stem cells) in primary and secondary spermatocytes and sperms (Krutzsch, 2009). Interestingly, there is an asynchrony between testicular and

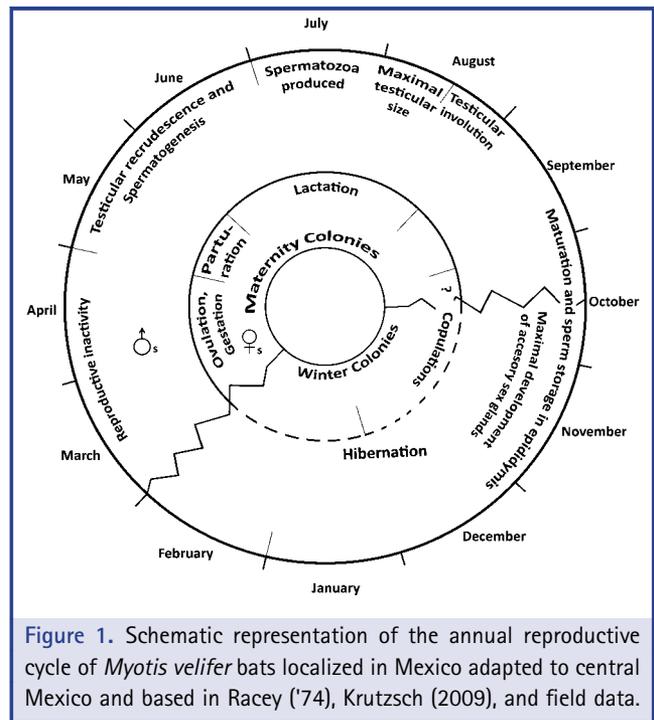


Figure 1. Schematic representation of the annual reproductive cycle of *Myotis velifer* bats localized in Mexico adapted to central Mexico and based in Racey ('74), Krutzsch (2009), and field data.

epididymal functions (sperm production, maturing, and storage), and during the following months (October and November) this asynchrony increases the reproductive potential to copulate and fertilize females (see Fig. 1; modified from Racey, '74; Krutzsch, 2009, and field data).

In recent years, the study of serotonin (5-hydroxytryptamine; $C_{10}H_{12}N_2O$) has gained relevance due to its importance in several biological functions. In reproduction, a major role has been proposed on the physiology of reproductive tract in males (Shishkina and Borodin, '89; Campos et al., '90; Frungieri et al., '99; Jiménez-Trejo et al., 2007, 2012; Pichardo et al., 2011). 5-HT is one of the main neurotransmitters in central nervous system (CNS), and supports many cellular functions such as growth, cellular differentiation and apoptosis both in vivo and in vitro. Interestingly, in peripheral nervous system (PNS), it is considered as a neurohormone (Vanhuotte, '85; Gaspar et al., 2003).

Both tryptophan hydroxylase (TPH) and monoamine oxidase (MAO_A) are important enzymes within 5-HT metabolic pathway. TPH is the rate-limiting enzyme for 5-HT synthesis (Fitzpatrick, '99; Zhang et al., 2004; Adayev et al., 2005) and is encoded by two different genes; TPH1 which is predominantly expressed in peripheral tissues, and TPH2 which is preferentially expressed in the brain (Walther and Bader, 2003; Walther et al., 2003). The discovery of a dual genetic basis for central and peripheral 5-HT biosynthesis, which is conserved in animal species, suggests that both neural and non-neural functions of 5-HT have distinct physiological roles including those belonging to reproduction

Grant sponsor: CONACYT; grant number: 80338; grant sponsor: PAPIIT, México City, México; grant numbers: IN219710-2, IN210412.

Conflicts of interest: None.

*Correspondence to: Francisco Jiménez-Trejo, Facultad de Química, Laboratorio de Biología de la Reproducción, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, México, Distrito Federal, Mexico. E-mail: trejofj@hotmail.com

Received 12 December 2012; Revised 29 January 2013; Accepted 9 February 2013

DOI: 10.1002/jez.1789

Published online XX Month Year in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

related processes. MAO_A is an enzyme that degrades amine neurotransmitters, such as 5-HT. This enzyme is localized into the outer mitochondrial membrane and catabolizes 5-HT into its metabolite 5-hydroxyindole-3-acetaldehyde (5-HIAL), which is further reduced by aldehyde reductase to 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA).

5-HT is synthesized and contained in cells of different organs including testes, epididymis, deferent ducts, prostate and human sperm (Tinajero et al., '93; Frungieri et al., '99, 2002; Jiménez-Trejo et al., 2007, 2012; Pichardo et al., 2011).

In Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and rats, 5-HT increases during seasonal breeder stages and sexual activity, when testosterone production increases (Frungieri et al., 2002; Jiménez-Trejo et al., 2007; Pichardo et al., 2011). Interestingly, Campos et al. ('90) demonstrated that 5-HT is localized in Leydig cells in testicular interstices and in mast cells of testicular capsule of rats. It appears that Leydig cells contain TPH1 enzyme; however it has not been fully demonstrated.

Furthermore, in the caput epididymis, we demonstrate the existence of a local serotonergic system in adult rat (Jiménez-Trejo et al., 2007) and we recently described components of serotonin system in human sperm (Jiménez-Trejo et al., 2012).

The aim of the present study was to investigate the presence, localization, and content variations of 5-HT in testes during the testicular cycle of *M. velifer* using Falck-Hillarp method (Klemm, '82) and immunofluorescence technique using a specific monoclonal antibody. Furthermore, we used ELISA to quantify 5-HT concentration and immunodetection by Western blot to quantify MAO_A and TPH expression during reproductive testicular cycle. Our results suggest that 5-HT, and both TPH and MAO_A enzymes are present in testes and show differential expression along the year. In this work, we show that 5-HT may play an important role in bats testicular function.

MATERIALS AND METHODS

Adult males of *M. velifer* were captured during 2009–2011 in two different shelters in Central Mexico ("Chicomostoc cave" 19° 57'54 N, 97°36'09 W, 1,420 m elevation; and "El Túnel" 19°37'14 N, 98°02'02 W, 3,220 m elevation). We visited those two localities because bats move to higher ground in fall, to mate and hibernate, and then, return to the shelters of lower altitude in late winter, to restart spermatogenesis process. Bats were captured during the evenings. Individuals were sexed, weighed using Ohaus® portable electronic balance (± 0.01 g), and their forearm length was measured with a Vernier caliper (± 0.1 mm). To ensure adult status of bats, only those animals with complete ossification of the cartilaginous epiphyseal growth plates of the fourth metacarpal-phalangeal joint were selected (Kunz and Anthony, '82; León-Galván et al., 2005).

For this research, the testes of 15 *M. velifer* were used. Three groups with five bats each were made for each of the following periods of the year: from March to April (testes inactivity), June to

July (recrudescence and spermatogenesis), and October to November (regression and stop spermatogenesis). *M. velifer* is not listed as endangered species in The Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010), and the protocol for the handling of animals was approved by the National Animals Rights Committees.

Before sacrifice through decapitation, all animals were anesthetized with ether, and the testes and brainstem tissues were isolated, weighed in a balance Mettler model AB204 (± 0.01 mg), and frozen in liquid nitrogen (-170°C), until samples were used.

Histochemistry to Detect 5-HT Vesicles in Testes

Bat testes were excised, cut in 12 μm thick sections using a cryostat which were immediately placed in a vacuum chamber for 15 min to maintain adherence (Klemm, '82). After vacuuming the slides, tissues were placed in a solution containing 1% paraformaldehyde and 8% glyoxylic acid in phosphate buffer solution (0.1 M PBS, pH 7.4) at 4°C for 10 min; control slides were placed only in PBS. The samples were dried and immediately placed at 100°C for 10 min. Bat brain stem sections were processed as above and were used as positive control. Some slides were counterstained with Hoechst 33258 (Hoechst) stain in order to visualize the cell nuclei. After three washes with PBS (10 min each), sections were mounted with fluorescence commercial medium (Fluorescent Mounting Medium, DAKO, DakoCytomation, CA, USA). Positive molecules of 5-HT were counted as signal if we detect small size, yellow fluorescence (Klemm, '82).

Indirect Immunofluorescence to Localize 5-HT in Testes

Sections of testes from different periods of the year (see above) were obtained using a cryostat (12 μm thick), mounted onto gelatin-coated slides, and fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in phosphate buffer (PB 0.1 M, pH 7.4). Tissues preparations were used for detecting 5-HT as previously described (Jiménez-Trejo et al., 2007). Antibody used here was characterized and their specificity and cross-reactivity confirmed, it was mouse monoclonal anti 5-HT (1:100; Genetex Inc. Irvine, CA, USA). Again, brain stem sections were used as positive control. The slides were coverslipped with Dako fluorescence mounting medium (DAKO). In control experiments, slides were incubated with preimmune serum. Experiments were performed in triplicate.

The sections were visualized and images acquired using a Nikon E600 microscope equipped with a digital camera (Nikon, Melville, NY). Images were digitized and figures elaborated using Adobe Photoshop software 10.0.1 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

Quantitative Determination of Serotonin During Annual Reproductive Cycle

To determinate 5-HT concentration in testes and epididymis during different stages of the reproductive cycle in *M. velifer* we

used an Ultra-sensitive Enzyme Immunoassay Kit (ELISA) according to the protocol suggested by the manufacturer (Alpco™ Immunoassays; Alpco Diagnostics; Keewaydin Drive, Salem, NH). Results are expressed in nanograms of 5-HT/milliliter (ng/mL) of homogenized tissue samples. Statistical comparisons among different periods were carried out with a one-way ANOVA (significance level set at $P < 0.05$) followed by Tukey test.

Western Blot to Detect Enzymes Involved in 5-HT Metabolism

Tissue samples during annual reproductive cycle were processed for SDS-PAGE as previously described (Jiménez-Trejo et al., 2007, 2012; Torres-Flores et al., 2008). Both brain stem and testes samples were prepared for Western blot analysis and immunoblots were performed using the following antibodies: (1) goat polyclonal anti TPH (C-20; 1:2,500) and (2) rabbit anti-MAO_A (1:3,500; $n = 5$ for each treatment), both antibodies were supplied by Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Control slides were incubated with preimmune serum.

Images of these films were captured, digitized, and densitometrically analyzed with the software Image J v.1.46 (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). All measurements were corrected based upon the average value of each film's background. Statistical comparisons among different periods of the annual testicular cycle were carried out with a one-way ANOVA (significance level set at $P < 0.05$) followed by Tukey test.

RESULTS

Serotonin is Present in Leydig Cells of *M. velifer* Along Its Reproductive Cycle

Figure 2A shows a digital photomicrograph of Raphe nuclei neurons containing 5-HT vesicles distributed in cytoplasm (arrows) that were used as positive control. The inset of Figure 2A is a brainstem slide that shows negative control; representative testes from animals collected during March and April, are shown in Figure 2B, which are significantly reduced in both size and weight; seminiferous tubules are reduced in length and their lumens are closed and show a regular oval form, clusters of Leydig cells are observed in the interstitial zone filled with fluorescent positive vesicles containing 5-HT in their cytoplasm (arrows).

Presumptive Leydig cells of the interstitial zone containing positive 5-HT vesicles, and some disperse, heterogeneous vesicles are observed in the seminiferous tubules of animals collected in the months of June and July (arrows in Fig. 2C). In this period, the diameter of the oval lumen of seminiferous tubules is greater as compared to the previous one (asterisk). Finally, Figure 2D show testicular tubules of testes of bats collected in October–November. We detect 5-HT in vesicles of Leydig cells of the interstitial zone (arrows) as a yellow precipitate and also we observed a positive specific fluorescence signal for 5-HT into the seminiferous tubules, suggesting that Sertoli cells are containing 5-HT at this stage.

In order to confirm the presence of 5-HT in bat testes, we performed an immunofluorescence detection for it at all reproductive stages. Representative images showing fluorescence signal in vesicles of some Leydig cells in testes from March to April period are shown in Figure 3A. In this period the presence of vesicles containing 5-HT was scarce and only present in interstitial cells (arrows). The inset of Figure 3A is a brainstem slide that shows positive control. 5-HT immunofluorescence in testes of animals collected in June and July shows that Leydig cells clusters in interstitial zone enlarge considerably (arrows in Fig. 3B). Apparently, in this period the diameter of the oval lumen of seminiferous tubules is higher and might be expanding by (1) both an increase in the number of Leydig and Sertoli cells or (2) an enlargement of the individual cells when compared with the previous period. Figure 3C shows a representative panoramic view of testes positive to 5-HT in period of October–November (arrow). Higher magnifications at this period reveals that 5-HT immunolocalization is evident in cytoplasm of Leydig cells localized in the interstitial zone (Fig. 3D; arrow) and some tubules containing vesicles positive for 5-HT into the seminiferous tubules. In this period the testes are smaller in size, length, and stretch and importantly the seminiferous tubules were irregular both in size and form (asterisks). Finally, Figure 3E shows the control slides incubated with preimmune serum and we found no positive signal (arrow), whereas Hoechst counterstaining images are shown for A', B', and E' periods.

5-HT Concentration Varies During Annual Reproductive Cycle

We quantified the production of 5-HT through ultra-sensitive method ELISA, and we confirmed the presence of 5-HT in testes and epididymis at different periods (Fig. 4). These studies showed that 5-HT concentration varies between March and November (involution period) in bat testes (Fig. 4A). ELISA analysis also documented that the concentration of 5-HT tends to decrease in testes during spermatogenesis period (June–July). The increment reached statistical significance when compared with inactivity and involution testes (asterisks). We validated the patterns on 5-HT concentration in blood and brain in different samples of *M. velifer* and found no significant differences in variations of concentration (data not shown). It is interesting to note that 5-HT concentrations in epididymis were higher but experienced no changes during the different periods. This is remarkable if we consider that the epididymis is one of the sites of 5-HT synthesis in organs related with reproduction in males (for further discussions, see Jiménez-Trejo et al., 2007).

MAO_A and TPH Protein Content Varies During Annual Reproductive Cycle

Western blot analysis suggested the presence of both enzymes MAO_A and TPH in testes and epididymis homogenates and showed variations of expression during annual reproductive testicular cycle.

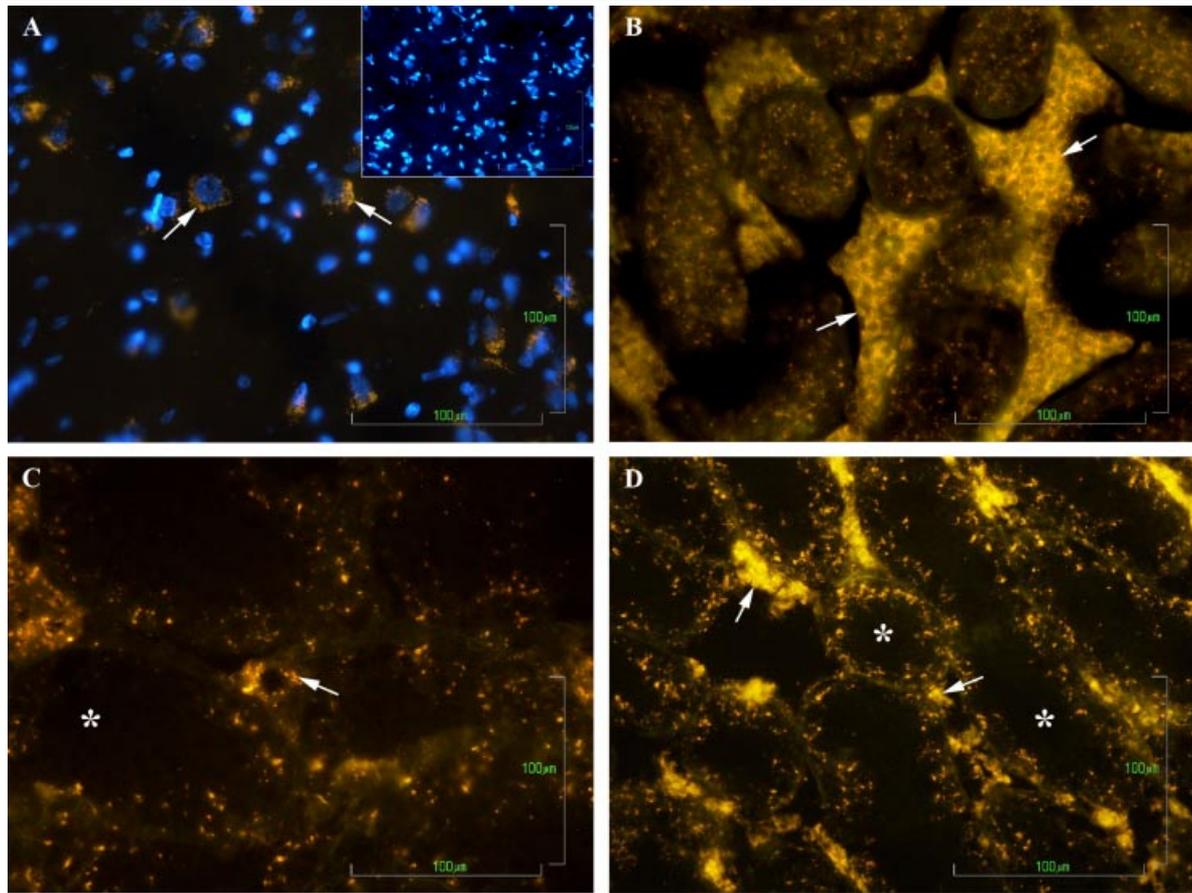


Figure 2. Photomicrographs that shows positive histochemical reaction to 5-HT in testes of *Myotis velifer* during annual testicular cycle, using the Falck-Hillarp method. (A) Positive vesicle staining in yellow fluorescence to 5-HT in cytoplasm of neurons of bat brainstem used as positive control (arrows). The insert shows a negative control. (B) Photomicrography of testes involution (March–April) showing positive fluorescence in vesicles observed in the cytoplasm of Leydig cells and inside of seminiferous tubules (arrows). In this period the testes reduces size and the lumen of seminiferous tubules is closed. (C) Testes in the period of June–July show active spermatogenesis and positive vesicles of 5-HT in Leydig cell (arrow), and the diameter of the lumen in the seminiferous tubules increases (asterisk). (D) Testes in the period of October–November show regression with both small size and oval shape, and the lumen in the seminiferous tubules is irregular (asterisks). The positive fluorescence signal by 5-HT is alike at the last period in Leydig cells (arrows).

We used adult brain of *M. velifer* as a positive control, and TPH was identified predominantly as a single band with a molecular weight of around ~48 kDa (data not shown). Furthermore, we detect two protein bands in the molecular weight range of TPH (~48 kDa, Fig. 5A) and MAO_A (~61 kDa, Fig. 5B) in both testes and epididymis and interestingly they showed a differential expression during annual reproductive cycle. β-Actin was used as protein loading control (Fig. 5C). EM indicates epididymis of March–April; TM testes of March–April; EJ epididymis of June–July; TJ testes of June–July; EN epididymis of October–November; and TN testes of October–November.

Densitometric analysis revealed differences in the intensity of the immunostained bands as bats matured during annual

testicular cycle. Figure 5D corresponds to TPH in densitometric analysis to both testes and epididymis respectively, and Figure 5E shows MAO_A in bat testes and epididymis. Both proteins show variations during the different stages of testicular cycle, but they show different pattern of expression.

DISCUSSION

The broad-spectrum of mammals have a continuous reproductive cycle during all year round, where both gonad activity and secondary sexual organs in males depend on testicular function and are mainly regulated by testosterone produced in Leydig cells (Tinajero et al., '93). However, some species of mammals are seasonal and display all reproductive characteristics (behavior,

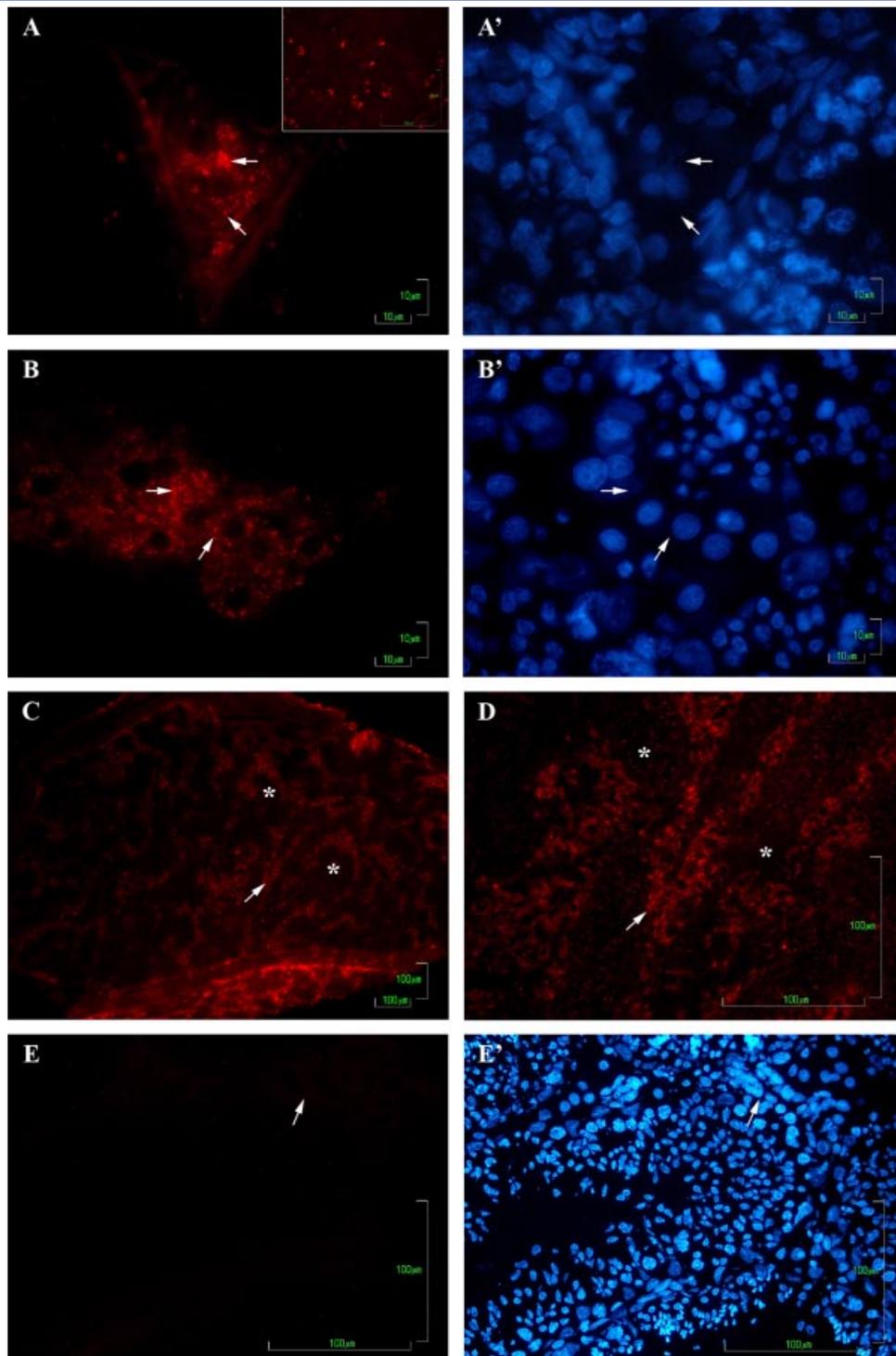


Figure 3. Continued.

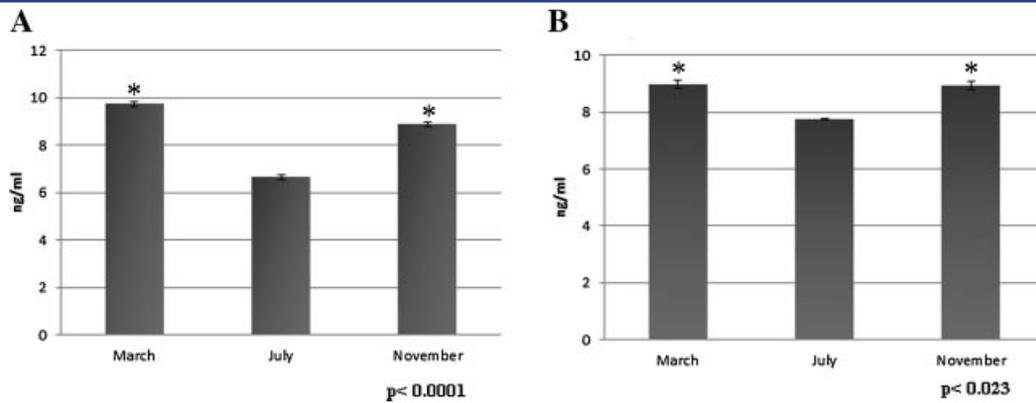


Figure 4. Quantitative analysis of ELISA assay for 5-HT, which shows variations in concentration during annual reproductive cycle. July is the stage with lowest concentration, while March and November show higher levels of 5-HT in both, testes and epididymis. One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. * $P < 0.0001$ in (A; testes), $P < 0.023$ in (B; epididymis).

courtship, and mating) in a short period of time. So, their reproductive testicular pattern is similar to other mammals, but it is restricted to a period of the year (Frungieri et al., '99; Krutzsch, 2009).

The bats enter in torpor or hibernation at the end of autumn and show both involution of testes and hypertrophy of accessory sexual glands which remain active throughout winter. In the *M. velifer* bat, both spermatogenesis and Leydig cells activity starts in late summer and autumn; and in late autumn is when mating begins (Gustafson, '87; Krutzsch, 2000, 2009).

The present study describes for the first time the presence of 5-HT along testicular annual cycle in *M. velifer* bat. In the testis of mammals, 5-HT is commonly located in Leydig cells in the interstitial zone, mast cells situated in the testicular capsule, and in the testicular blood flow (Tinajero et al., '93; Collin et al., '96; Frungieri et al., '99). Campos et al. ('90) reported that an appreciable amount of testicular 5-HT could be derived from a serotonergic innervation of the gonads, mainly from the capsular innervation, because the specific denervation of superior spermatic nerve produces a significant decrement in the capsular and interstitial fluid 5-HT content (34%).

Because 5-HT is stored in dense-core vesicles in cytoplasm of some neurons, principal cells of the caput epididymis and rodent's Leydig cells, we decided to use both Falck-Hillarp and immunofluorescence methods to search for this indoleamine in bat testes. This techniques are relatively simple, highly sensitive and specific for localizing monoamines such as 5-HT at the cellular level (Klemm, '82; Hökfelt, 2010). In the present work we found a similar expression pattern of 5-HT with both techniques along all testicular annual cycle stages of bat. We found that 5-HT is present inside Leydig cells during all testicular cycle stages, and postulate that it probably acts as modulator of testosterone synthesis as it does in rat (Frungieri et al., 2005; Rossi et al., 2012). We do not exclude the possibility that some of the positive signal we found could be endothelial or mast cells (Frungieri et al., '99; Jiménez-Trejo et al., 2007), but the pattern of distribution and the cell shape we found were mainly those characteristic of Leydig cells (de Kretser and Kerr, '88). Because we did not found 5-HT-containing mast cell in testicular interstitial region such as described in other reports; we suggest that it is probably that mast cells in bat testes are located in the capsule around testicular blood vessels, as occurs in rodents (Campos et al., '90).

Figure 3. Photomicrographs that show 5-HT positive immunofluorescence in testes of *Myotis velifer* during annual testicular cycle. (A) Representative image obtained from testes from March to April period; positive 5-HT immunostaining was observed in vesicle-like structures inside the cytoplasm of Leydig cells (arrows); positive neurons of the brainstem slide were used as a positive control (inset); (B) image of testes during the spermatogenesis process in months June and July, 5-HT immunofluorescence was detected in vesicle-like structures in cytoplasm of Leydig cells localized exclusively in interstitial zone (arrows); (C) panoramic view of testes from October to November period; and (D) shows amplification of (C) illustrating narrowed seminiferous tubules and with tiny lumen (asterisks), in this period the testicular involution is evident; (E) show the control images when the slides were incubated with preimmune serum were we found no positive signal (arrow). Hoechst counterstaining images are shown for each period (except for C and D) and denoted with an apostrophe.

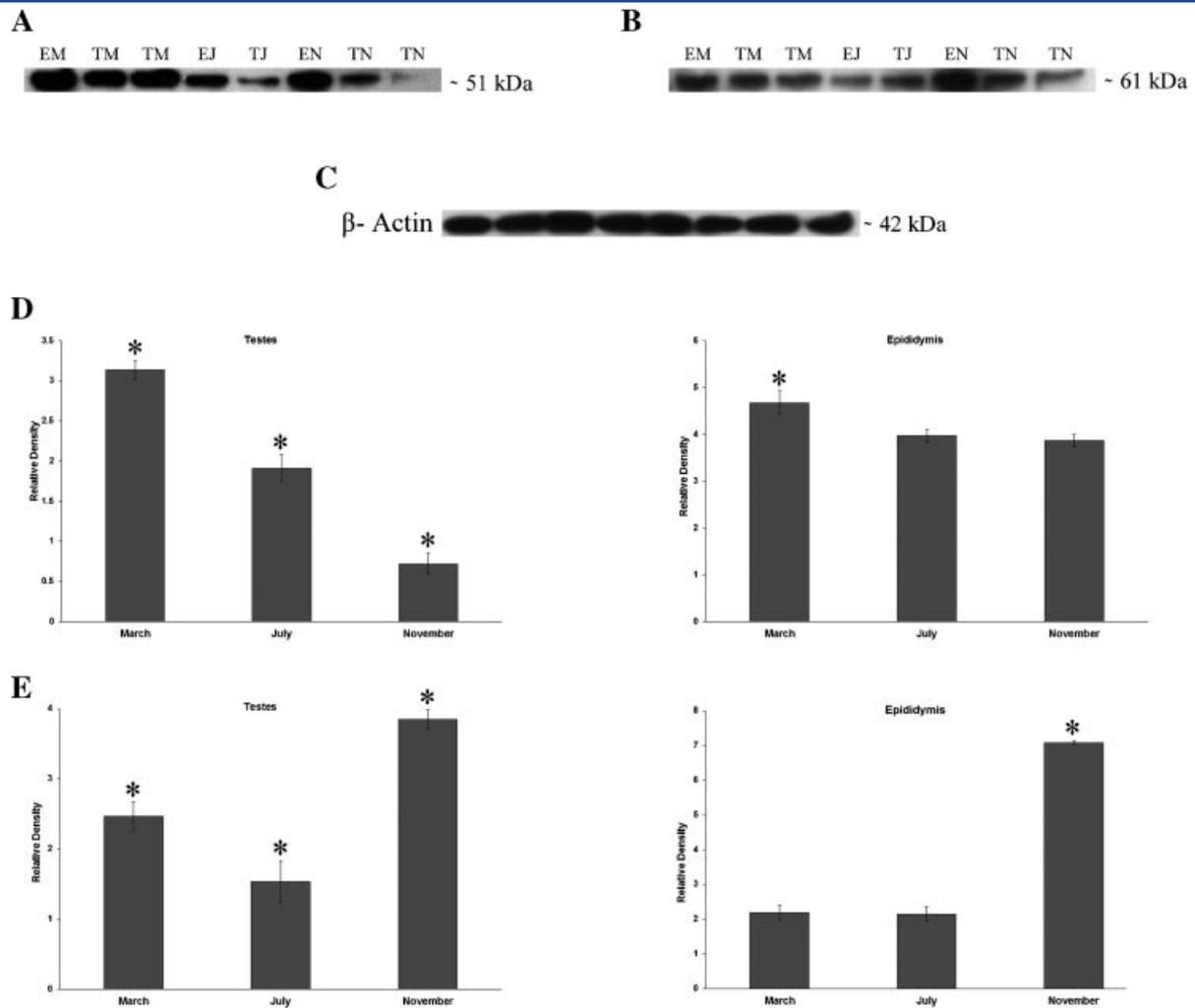


Figure 5. Representative Western blots of TPH, MAOA, and β -actin control (A, B, and C, respectively; EM indicates epididymis of March–April period; TM testes of March–April; EJ epididymis of June–July; TJ testes of June–July; EN epididymis of October–November; and TN testes of October–November). Densitometric analysis of both testes and epididymis to TPH (D) and MAOA (E) during different periods are shown. Please note that content variations are dependent on the reproductive stage. One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. $*P < 0.0005$.

5-HT signal in presumptive Sertoli cells during October–November phase was also detected. Because those months are the time window when sperm are transported from testis to epididymis for further maturation and storage, it is likely that 5-HT could participate in such process; however, we recognize that more deep and diverse experimental approaches are necessary to validate this idea. Nevertheless, our results strongly support the fact that 5-HT is present in bat testis as well, expanding the previously proposed idea that 5-HT is a modulator of the sperm maturation and fertilization processes in mammals (Jiménez-Trejo et al., 2007, 2012; Fujinoki, 2011).

We also found that both TPH and MAOA show variation in their expression in both testes and epididymis in *M. velifer*. TPH signal was found higher during the end of the hibernation phase, where no spermatogenesis is present. Because testosterone is increased during spermatogenesis period (Gustafson and Shemesh, '76; Gustafson, '87) and MAOA is increased in the beginning of the hibernation phase, the same time point where TPH is at its lower levels, it is tempting to postulate that testosterone and 5-HT form an on/off mechanism for the spermatogenesis process in testes of *M. velifer*. In support of this idea, it has been reported that 5-HT in coordination with corticotropin releasing factor (CRF) negatively

regulates the synthesis of testosterone in an autocrine way through 5HT₂ receptors (Campos et al., '90; Tinajero et al., '93). However, further experiments must be done to be able to confirm this idea.

An additional role for MAO_A activity has been described in rat testes (Ellis et al., '72); because MAO_A is a mitochondrial enzyme that catalyzes 5-HT and other biogenic amines and this activity generates biomolecules that promotes cellular responses in others reproductive tissues such as prostate, it is probable that in both testes and epididymis MAO_A activity may contribute to the testicular cycle also in this way (White et al., 2012).

In conclusion, our results from the present work strongly suggest the presence of 5-HT in *M. velifer* testes; we found its contents vary with the different reproductive phases of the bat, suggesting that at least this indolamine is modulated in the progression of the bat reproductive cycle. Because (1) this mammalian specie shows a shortened reproductive cycle and (2) we found both TPH and MAO_A contents also vary in different ways, we postulate that 5-HT and testosterone could integrate a putative clock mechanism for the spermatogenesis process of bat. Because we had previously reported that serotonergic components are present in reproductive tissues of different mammals (Jiménez-Trejo et al., 2007, 2012; Pichardo et al., 2011), it is possible that 5-HT could be an ancient mechanism of modulation in the reproductive functions, but more work must to be done to confirm this hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks Patricia Padilla and Ana Myriam Boeta Acosta. We also thank Dr. Gabriel Manjarrez-Gutiérrez for her valuable technical assistance.

LITERATURE CITED

- Adayev T, Ranasinghe B, Banerjee P. 2005. Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Biosci Rep* 25:363–84.
- Arenas-Ríos E, León-Galván MA, Mercado PE, et al. 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* 140:150–8.
- Bronson FH. 1985. Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biol Reprod* 32:1–26.
- Campos MB, Vitale ML, Calandra RS, Chiochio SR. 1990. Serotonergic innervation of the rat testis. *J Reprod Fertil* 88:465–79.
- Collin O, Damber JE, Bergh A. 1996. 5-Hydroxytryptamine a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. *J Reprod Fertil* 106:17–22.
- de Kretser DM, Kerr JB. 1988. The cytology of the testis. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. p 999–1080.
- Ellis LC, Jaussi AW, Baptista MW, Urry RL. 1972. Correlation of age changes in monoamine oxidase activity and androgen synthesis by rat testicular minced and teased preparation in vitro. *Endocrinology* 90:1610–8.
- Fitch HJ, Shump AK, Shump UA. 1981. *Myotis velifer*. *Mamm Species* 1149:1–5.
- Fitzpatrick PF. 1999. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 68:355–81.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Rubio M, et al. 1999. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology* 69:299–308.
- Frungieri MB, Zitta K, Pignataro OP, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. 2002. Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic and corticotropin-releasing factor systems modulating the cAMP and testosterone production in the Golden hamster. *Neuroendocrinology* 76:35–46.
- Frungieri MB, Mayerhofer A, Zitta K, et al. 2005. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 146:1541–52.
- Fujinoki M. 2011. Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* 142:255–66.
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4:1002–12.
- Gustafson AW. 1987. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular cycle of the bat *Myotis lucifugus* lucifugus: histology and lipid histochemistry. *Am J Anat* 178:312–25.
- Gustafson AW, Shemesh M. 1976. Changes in plasma testosterone levels during the annual reproductive cycle of the hibernating bat, *Myotis lucifugus lucifugus* with a survey of plasma testosterone levels in adult male vertebrates. *Biol Reprod* 15:9–24.
- Höckfelt T. 2010. Looking at neurotransmitters in the microscope. *Prog Neurobiol* 90:101–18.
- Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Queiroz DBC, et al. 2007. Serotonin concentration, synthesis, Cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies. *J Androl* 28:136–49.
- Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez MT, Cervantes MC, et al. 2012. Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. *Reproduction* 144:1–10. DOI: 10.1530/REP-12-0145
- Klemm N. 1982. A Modified glyoxylic acid-formaldehyde technique for histofluorescence of catecholamine-containing neurons in cryostat sections of the insect brain. *J Histochem Cytochem* 230:398–400.
- Krutzsch PH. 2000. Anatomy, physiology and cyclicity of the male reproductive tract. In: Crichton EG, Krutzsch PH, editors. *Reproductive biology of bats*. London: Academic Press. p 1–155.

- Krutzsch PH. 2009. The reproductive biology of the cave Myotis (*Myotis velifer*). *Acta Chiropterol* 11:89–104.
- Kunz HT, Anthony ELP. 1982. Age estimation and post natal growth in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *J Mammal* 63:23–32.
- León-Galván MA, Fonseca T, López-Wilchis R, 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.
- León-Galván MA, López-Wilchis R, Hernández-Pérez O, et al. 2005. Male reproductive cycle of Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Southwestern Nat* 50:453–60.
- Pichardo AI, Tlachi-López J, Jiménez-Trejo F, et al. 2011. Increased serotonin concentration and tryptophan hydroxylase activity in reproductive organs of copulator males: a case of adaptive plasticity. *Adv Biosci Biotechnol* 2:75–84.
- Racey PA. 1974. The reproductive cycle in male noctule bats, *Nyctalus noctula*. *J Reprod Fertil* 41:169–82.
- Rossi SP, Matzkin ME, Terradas C, et al. 2012. New insights into melatonin/CRH signaling in hamster Leydig cells. *Gen Comp Endocrinol* 178:153–63.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Executive Branch of the United States of Mexico, Mexico City, 30 December, 2010.
- Shishkina GT, Borodin PM. 1989. Involvement of brain serotonin in regulation of sexual maturity in male rats. *Neurosci Behav Physiol* 74:118–23.
- Sinha-Hikim AP, Bartke A, Russell LD. 1988. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings, *Biol Reprod* 39:1225–37.
- Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR, Dufau ML. 1993. Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology* 133:3026–9.
- Torres-Flores V, Hernandez-Rueda YL, del Neri-Vidaurre P, et al. 2008. Activation of protein kinase A stimulates the progesterone-induced calcium influx in human sperm exposed to the phosphodiesterase inhibitor papaverine. *J Androl* 29:549–57.
- Vanhuotte MD. 1985. Serotonin and the cardiovascular system. New York: Raven Press. p. 288.
- Walther DJ, Bader M. 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 9:1673–80.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, et al. 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299:76.
- White TA, Kwon EM, Fu R, et al. 2012. The monoamine oxidase a gene promoter repeat and prostate cancer risk. *Prostate* 72:1622–1627.
- Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. 2004. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* 5681:217.