



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS DE
ESPERMATOCITOS EN DOS ESPECIES DE MURCIÉLAGOS
FILOSTÓMIDOS: *Sturnira lilium* y *Artibeus jamaicensis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

ZACAULA JUÁREZ NOÉ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
I. RESUMEN.....	9
II. ABSTRACT.....	10
III. INTRODUCCIÓN.....	11
1) Determinación sexual en mamíferos.....	11
a) Determinación sexual primaria	
b) Determinación sexual secundaria	
c) Origen de las células germinales primordiales	
d) Genes involucrados en la línea germinal.	
e) Morfología del testículo	
2) Espermatogénesis.....	17
3) Generalidades de los murciélagos.....	28
<i>Artibeus jamaicensis</i>	
<i>Sturnira liliium</i>	
IV. JUSTIFICACIÓN.....	34
V. HIPÓTESIS.....	34
VI. OBJETIVOS.....	34
a) Objetivo general	
b) Objetivos particulares	

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
1) Colecta.....	35
2) Sacrificio.....	36
3) Morfometría testicular macroestructural de <i>Artibeus jamaicensis</i> y <i>Sturnira lilium</i>.....	37
4) Morfometría testicular microestructural de <i>Artibeus jamaicensis</i> y <i>Sturnira lilium</i>.....	37
5) Inmunohistoquímica de <i>Artibeus jamaicensis</i> y <i>Sturnira lilium</i>.....	38
6) Tinción Coomasie.....	39
7) “Western blot”.....	39
VIII. RESULTADOS.....	41
1) Morfometría testicular macroestructural de <i>Artibeus jamaicensis</i>: peso, longitud del antebrazo, tamaño de los testículos y diámetro de los túbulos seminíferos.....	41
2) Morfometría testicular microestructural de <i>Artibeus jamaicensis</i>.....	42
a) Conteo celular del epitelio seminífero.....	42
b) Identificación de células progenitoras de espermatocitos (espermatogonias A).....	43
c) Ciclo del epitelio seminífero.....	47
3) Morfometría testicular macroestructural de <i>Sturnira lilium</i>: peso, longitud del antebrazo, tamaño de los testículos y diámetro de los túbulos seminíferos.....	55

4) Morfometría testicular microestructural de <i>Sturnira lilium</i>.....	56
d) Conteo celular del epitelio seminífero.....	56
e) Identificación de células progenitoras de espermatocitos.....	57
f) Ciclo del epitelio seminífero.....	60
5) Inmunohistoquímica de <i>Artibeus jamaicensis</i>.....	67
g) Detección de los marcadores C-KIT, OCT-4, H3 y VASA.....	67
h) Análisis de la actividad proliferativa mitótica (H3) y meiótica (SCP1).....	71
i) Expresión del factor de transcripción temprana (WT-1) y de la hormona antimülleriana (MIS).....	72
6) Inmunohistoquímica de <i>Sturnira lilium</i>.....	73
j) Detección de los marcadores C-KIT, OCT-4, H3 Y VASA.....	73
k) Análisis de la actividad proliferativa mitótica (H3) y meiótica (SCP1).....	76
l) Expresión del factor de transcripción temprana (WT-1) y de la hormona antimülleriana (MIS).....	77
m) Tinción Coomasie.....	78
7) Análisis de la reactividad y especificidad de los marcadores (C-KIT, OCT-4, VASA, H3 y WT-1) por “Westernblot”.....	79
IX) DISCUSIÓN.....	81
X) CONCLUSIONES.....	85
XI) REFERENCIAS.....	87
XII)ANEXO.....	94

DEDICATORIA

A mi mamá GUADALUPE J. JUAREZ CARREÓN por haberme brindado su apoyo incondicionalmente durante todo este tiempo y así poder realizar mis sueños Gracias.

A mis hermanos: ASLEY y CARLOS.

A: ENZO

A toda mi Familia.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el departamento de Biología Celular y Fisiología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, como tutor Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

A los revisores:

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
Biol. Héctor Barrera Escorcía
Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
M. en C. Atahualpa Eduardo de Sucre Medrano
Dr. Enrique Martínez Meyer

El presente trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, No. IN218908)

Al apoyo Técnico:

Biol. Patricia Espinoza Cueto
M. en C. Esmeralda Lira Romero

AGRADECIMIENTOS

A todos mis amigos y amigas con los que compartí una parte importante de mi vida. Por todos aquellos buenos y malos momentos. A TODOS USTEDES QUE AUNQUE NO ESTEN SUS NOMBRES SABEN QUE SON PARTE DE MI VIDA. GRACIAS.

A mis compañeros de laboratorio:

Sandra Milena Estévez

Tania Porras Gómez

Esmeralda Lira Romero

Al laboratorio:

Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Dr. Horacio Merchant Larios

Gracias por las facilidades prestadas en sus respectivos laboratorios.

*Solo somos sombras vagando en la oscuridad
Somos sin saber por que
Tratamos de vislumbrar un pequeño resquicio de luz
Imaginamos, pensamos, creamos y jugamos
En busca de los misterios de la vida
Caminamos ciegos
En busca de la eternidad.*

Noé Zacaula Juárez

I. RESUMEN

El ciclo del epitelio seminífero en mamíferos comprende una serie de asociaciones celulares resultado de un proceso continuo de diferenciación celular (espermatogénesis), que incluye 3 fases: proliferación mitótica, división meiótica y la espermiogénesis.

El estudio morfológico de *Sturnira lilium* y *Artibeus jamaicensis* permitió analizar, el ciclo del epitelio seminífero, el cual presenta un patrón típico respecto a otros mamíferos. Este incluye las XIV etapas y 19 estadios de la espermiogénesis en ambas especies. Se encontró un ciclo espermatogénico completo por lo cual se identificaron los subtipos celulares de espermatogonias madre (A): As, Apr, Aal, A1, A2, A3, A4, intermedias y tipo B así como espermatocitos primarios, secundarios, espermátides redondas, alargadas en diferentes grados de desarrollo y espermatozoides. Por inmunohistoquímica se detectó la expresión de las diferentes proteínas marcadoras de algunas etapas y condiciones específicas, usando anticuerpos policlonales, entre ellas VASA se presentó en las células progenitoras de la línea germinal. OCT-4 un factor de pluripotencialidad en células germinales y C-KIT un factor de células madre se encontró en las espermatogonias A. El marcador de la actividad mitótica H3 se localizó en las espermatogonias A; mientras que el marcador de meiosis SCP1 se encontró en espermatocitos primarios y secundarios.

Se determinó la especificidad y reactividad de los anticuerpos (H3, Wt-1, C-kit, Vasa y Oct-4) por "Western blot", en homogeneizados testiculares. Se obtuvieron los pesos esperados para H3 de 17 kDa, WT-1 de 53 kDa, C-KIT de 145 kDa, VASA de 76 kDa. En cambio para OCT-4 (50 kDa) no se encontró el peso esperado, encontrándose una banda de 60 kDa. Todas las proteínas se detectaron en ambas especies. Se encontró un ciclo espermatogénico completo por lo cual se identificaron todos los subtipos celulares de espermatogonias A: As, Apr, Aal, A1, A2, A3, A4, intermedias y tipo B así como espermatocitos paquiténicos, zigoténicos, espermatocitos secundarios, espermátides redondas y alargadas en diferentes grados de desarrollo y espermatozoides. Se presentaron ciclos de espermatogénesis continuos a lo largo del año sin observarse periodos de regresión testicular, debido a que son murciélagos tropicales, por lo tanto la disponibilidad de alimento cubre los requerimientos energéticos.

II. ABSTRACT

The cycle of seminiferous epithelium in mammals involves a numerous cellular associations result of a continuous process of cellular differentiation (spermatogenesis), which includes 3 phases: mitotic proliferation, meiotic division and spermiogenesis.

The morphology study of bats *Sturnira lilium* and *Artibeus jamaicensis* possible to analyze the cycle of seminiferous epithelium which presents a typical pattern compared to others mammals. The cycle was divided into XIV stages and 19 steps of spermiogenesis in both species. We found a complete cycle spermatogenic at which identified the cellular subtypes of spermatogonial stem cells: As, Apr, Aal, A1, A2, A3, A4, intermediate, type B, primary spermatocytes, secondary, round spermatids, elongated in different levels of development and sperm.

Immunohistochemical assays detected expression of different marker proteins of some stages and specific conditions, using polyclonal antibodies, including VASA was presented in progenitor cells of the germ line. OCT-4 by a factor of pluripotency in stem cells and C-KIT stem cell factor was found in spermatogonia A. The mitotic marker H3 activity was found in spermatogonia A, while the meiosis marker SCP1 was found in primary and secondary spermatocytes.

We determined the specificity and reactivity of the antibodies (H3, Wt-1, C-kit, Vasa and Oct-4) by Western blot in testis homogenates. We obtained the expected weight of 17 kDa H3, WT-1 53-kDa, C-KIT 145-kDa, 76-kDa VASA. In contrast to OCT-4 (50 kDa) was not expected weight, finding a band of 60 kDa. All were detected in both species. We found a complete spermatogenic cycle at which identified all the cellular subtypes of spermatogonia A: As, Apr, Aal, A1, A2, A3, A4, intermediate, type B and pachytene spermatocytes, zygotene, secondary spermatocytes, round spermatids elongated in different stages of development and sperm. There were ongoing cycles of spermatogenesis throughout the year without periods of testicular regression observed, because they are tropical bats therefore covers the availability of food energy requirements.

III. INTRODUCCIÓN

1) Determinación sexual en mamíferos

a) Determinación sexual cromosómica

En mamíferos la determinación sexual primaria se refiere a la diferenciación del sexo de las gónadas, la cual es estrictamente cromosómica y se establece en el momento de la fecundación. La dotación de cromosomas sexuales XY promueve a la diferenciación testicular y el complemento XX promueve la formación de ovario (Gilbert, 2005). Por lo tanto la determinación de las gónadas puede ser en machos o hembras. Los machos al ser XY pueden generar dos tipos de espermatozoides: la mitad llevará un cromosoma X y la otra uno Y. La hembra es XX y cada uno de sus gametos tiene un cromosoma X. Si el gameto femenino recibe otro cromosoma X del espermatozoide resultara XX y por lo tanto la formación de ovarios; si el gameto recibe un cromosoma Y será XY formando testículos. El cromosoma Y lleva el gen *SRY* que codifica un factor determinante testicular (TDF), el cual organiza la gónada indiferenciada hacia testículos.

Los mecanismos que participan en la determinación sexual primaria en humanos incluyen inicialmente al gen *SRY* que se localiza en el brazo corto del cromosoma Y [figura 1]. Así como el gen autosómico *SOX9* que también puede inducir la formación testicular incluso en ausencia del gen *SRY* (Vidal y col., 2001). La proteína de *SOX9* puede actuar como un factor de empalme y como un regulador transcripcional. *SOX9* migra hacia el núcleo en el momento de la determinación sexual donde se une al sitio promotor del gen para el factor inhibidor de Müller, proporcionando el enlace en la vía hacia el fenotipo masculino (Arango y col., 1999; de Santa bárbara y col., 2000).

También se sugiere que *SRY* o *SOX9* funcionan a través de un mecanismo indirecto: *SRY* induce a las células de la cresta genital a secretar un factor quimiotáctico que permite la migración de las células mesonéfricas hacia la gónada (Capel y col., 1999). Después estas células inducen al epitelio gonadal a diferenciarse en células de Sertoli con patrones de expresión de genes específicos masculinos.

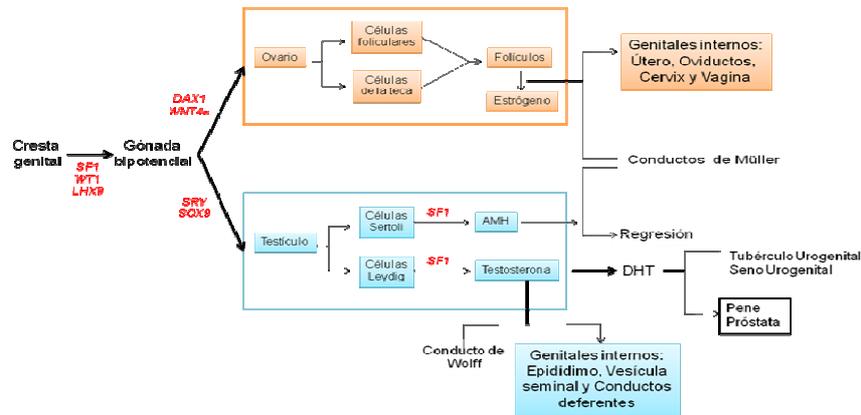


Figura 1. Esquema general de la determinación sexual. Cascadas postuladas que conducen a la formación de los fenotipos sexuales en mamíferos (Marx 1995, Birk y col., 2000).

b) Determinación sexual secundaria

La determinación sexual secundaria afecta al fenotipo fuera de las gónadas. Esto incluye al sistema de conductos femeninos, masculinos y a los genitales externos. Los machos tienen un pene, vesículas seminales y una glándula prostática. Las hembras tienen una vagina, cuello uterino, útero y trompas de Falopio.

En humanos, los rudimentos de la gónada aparecen en el mesodermo intermedio durante la cuarta semana de desarrollo y se mantienen sexualmente indiferentes hasta la séptima semana. Durante el estadio indiferenciado el epitelio de la cresta gonadal prolifera y se extiende hacia el tejido conectivo laxo mesenquimático. Estas capas epiteliales forman los cordones sexuales. Las células germinales migran hacia la sexta semana y son rodeadas por los cordones sexuales. Si el feto es XY continúan proliferando durante la octava semana y los cordones siguen desarrollándose formando los cordones sexuales internos (medulares) y, en el extremo más distal, la delgada rete testis. Por último los ahora denominados, cordones testiculares pierden contacto con el epitelio superficial y se separan de este por una matriz extracelular gruesa, la túnica albugínea.

Un inhibidor de la meiosis es producido por los cordones sexuales masculinos y las células germinales quedan en arresto mitótico (Koubova y col., 2006) y no inician la meiosis hasta la pubertad (McLaren y Southee 1997). Cuando se inhibe a las células germinales se secreta un factor (probablemente prostaglandina) que hace que las células del cordón testicular se diferencien a células de Sertoli (Adam y McLaren 2002). Las células de Sertoli de los túbulos seminíferos fetales secretan el factor inhibidor de Müller que posteriormente sustentan a los espermatozoides. En la pubertad los cordones se

ahuecan para formar los túbulos seminíferos y las células germinales migran a la periferia donde empiezan a diferenciarse en espermatozoides. En los túbulos seminíferos los espermatozoides son producidos y transportados desde el interior del testículo a través del rete testis, posteriormente a través de los conductos eferentes, al epidídimo que se forma a partir de conducto de Wolff y finalmente, a los conductos deferentes hasta llegar a la uretra. Mientras tanto las células de Leydig que producen la testosterona se forman a partir de las células mesenquimáticas en el desarrollo fetal de los testículos.

La determinación sexual secundaria implica el desarrollo del fenotipo masculino en respuesta a las hormonas secretadas por los testículos. Esta determinación tiene dos fases temporales: la primera se produce dentro del embrión durante la organogénesis; la segunda ocurre en la pubertad. La formación del fenotipo masculino involucra la secreción de hormonas testiculares. La primera es la hormona antimülleriana (FIM, HIM o MIS), producida por las células de Sertoli que causa la degeneración del conducto de Müller. La segunda es la testosterona, que es secretada por las células de Leydig fetales. Esta hormona hace que el conducto de Wolff se diferencie en epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales y hace que las prominencias urogenitales se desarrollen hacia escroto y pene.

c) Origen de las células germinales primordiales

Las células germinales son las que permiten la continuidad genética del individuo. En el embrión de los vertebrados, sus precursoras más primitivas: las células germinales primordiales (CGP) se originan en el epiblasto durante la segunda semana de desarrollo. Se desplazan por movimientos ameboides hasta el saco vitelino, al cual llegan a finales de la tercera semana. Desde ahí migran para establecerse en la cresta genital, que es el sitio donde se formará la gónada.

Las CGPs son fácilmente identificables al microscopio de luz cuando se encuentran en el endodermo del saco vitelino, pues no solo son más grandes y más claras que las células somáticas vecinas (Byskov, 1982; Motta y col., 1997); son basófilas y exhiben actividad fosfatasa alcalina en su citoplasma periférico. El tamaño promedio de CGP varía de (10-20 μm), según el tipo de organismo; son de una forma elíptica o esférica y de superficie lisa, aunque algunas emiten procesos citoplasmáticos, de modo que su cara externa es rugosa. La observación de las CGP al microscopio electrónico de transmisión y de barrido permiten apreciar su forma redonda y un diámetro que oscila entre (15-20 μm) (Byskov, 1986). El núcleo esférico ocupa una posición excéntrica y contiene una cromatina

granular muy fina y un número de nucléolos variable (Motta y col., 1997; Byskov, 1986). El retículo endoplásmico rugoso es abundante al igual que los poliribosomas libres. Cerca del núcleo se observan mitocondrias esféricas con crestas lamelares, así como un complejo de Golgi pequeño (Motta y col., 1997; Jeon y Kennedy, 1973). Las reservas energéticas de las CGP están representadas por depósitos de glucógeno y gotas de lípidos, necesarias para la migración hacia los pliegues gonadales (Byskov, 1982; Fukuda, 1976). También se encuentran unos pocos microfilamentos, centriolos y microtúbulos así como áreas focales de contacto estrecho con las células vecinas.

La migración se lleva a cabo por dos mecanismos, uno pasivo y otro activo. En el pasivo: los movimientos morfogénicos de la parte caudal del embrión en crecimiento ayuda a transportar a las CGP hasta la cresta genital. En el activo, esto sucede por movimientos ameboideos en los mamíferos; mientras que en las aves ocurre a través de los vasos sanguíneos, a los que las células penetran. Para posibilitar su migración, las CGP sintetizan receptores de membrana que les permite reconocer moléculas de la matriz extracelular sobre las que se desplazan, transfieren metabolitos a través de su membrana y sintetizan receptores específicos para las proteínas que participan en la quimiotaxis que ejercen las crestas genitales sobre ellas.

Resulta difícil seguir la ruta de migración de las CGP, sin embargo, se les puede localizar en el endodermo del alantoides y ubicarse después en la región posterior del saco vitelino, de ahí parten dos poblaciones que ascienden por ambos lados de la pared del intestino posterior, hasta alcanzar el mesenterio dorsal e invadir las crestas genitales. Hacia el día 11 del desarrollo en ratón, la mayoría de estas células se encuentra en los primordios de la gónada. Durante la migración estas células reducen su tamaño al perder reservas metabólicas y entrar en mitosis. Las CGP se dividen activamente durante su desplazamiento, así emprenden la migración alrededor de 100 células y la terminan cerca de 5000. Las CGP mueren si migran en dirección anormal o se quedan en sitios no apropiados de la ruta de migración, sin embargo, algunas pueden sobrevivir y originar tumores y teratomas debido a su crecimiento y diferenciación anormal. O diferenciarse en ovocitos y después perecer por apoptosis.

d) Genes involucrados en la línea germinal.

Los estadios de formación de la línea germinal están controlados por una cascada de genes reguladores (figura 2). Dicha cascada comprende la activación sucesiva de los

genes que controlan la inducción inicial y el desarrollo, proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de las células germinales primordiales.

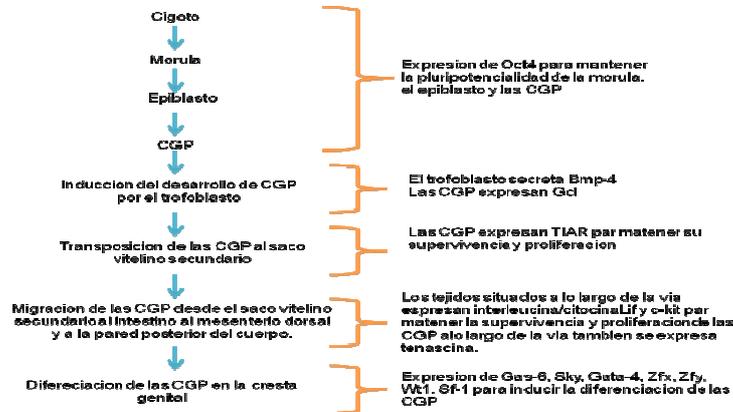


Figura 2. Cascadas de genes de regulación que controlan el desarrollo de las células germinales primordiales.

Los genes necesarios para la iniciación de la formación de las células germinales en animales inferiores son llamados genes de efecto materno. La activación de estos genes maternos regula la segregación del plasma germinal a una región específica del cigoto que durante la segmentación queda incorporada en un grupo de células que acaban formando los precursores de la línea germinal, por el contrario es probable que en los embriones de mamíferos todas las células primitivas incluidas la mórula sean capaces de formar células germinales pluripotenciales, pero esta capacidad queda limitada primero, a la masa de las células internas y después al epiblasto. Por tanto, en los mamíferos, la iniciación del desarrollo de la línea germinal requiere de la activación de los genes que mantienen la pluripotencialidad en las blastómeras, precursoras que terminarán por producir la línea germinal.

El gen *Oct4* codifica un regulador de la transcripción de dominio POU (Oct-4), su actividad se detecta en todas las células de la mórula aunque después se limita solo a las de la masa celular interna, más tarde en el epiblasto, este proceso requiere una señal inductiva procedente del trofoblasto, una señal candidato es la proteína morfogénica de hueso 4 (BMP-4). Aparentemente la BMP-4 activa genes tales como *Gcl* (Germ cell-less) en el interior de las futuras células germinales del epiblasto. Después la expresión de *Oct-4* es mantenida en el ectodermo embrionario y es regulado en la gastrulación por el eje anteroposterior. Después de esta etapa la expresión de *Oct-4* está limitada a las células germinales primordiales, que es mantenida hasta el inicio de la diferenciación sexual de

los gametos y la meiosis en hembras y hasta el inicio de la espermatogénesis en machos. (Pesce y col., 2000).

Cuando las futuras células germinales pasan al saco vitelino la expresión de factores tróficos en las CGP o en las células asociadas garantiza su proliferación y supervivencia. Un factor trófico expresado por las CGP, necesario para su supervivencia y proliferación es la proteína TIAR de unión al RNA. Parece que para la supervivencia y proliferación de las CGP a lo largo de la vía de migración desde el saco vitelino al intestino y al mesenterio dorsal y más tarde a la pared posterior del cuerpo son necesarios muchos otros factores tróficos entre ellos se encuentran varios expresados por los tejidos existentes a lo largo de la vía de migración, tales como los miembros de la familia del factor inhibidor de leucemia (LIF) y el ligando C-KIT, que regula la migración, proliferación y apoptosis de las células germinales primordiales durante el desarrollo de la gónada en etapa fetal. Así como la proliferación de las espermatogonias en etapa adulta. (Mauduit y col., 1999). Las células situadas a lo largo de la vía han de expresar también otros factores entre los que se encuentran proteínas de la matriz extracelular que dirigen la migración de las CGP.

Una vez que las CGP llegan a la futura gónada deben expresar numerosos genes que regulan la diferenciación final de las células de la línea germinal. Entre ellos se encuentran genes que codifican el factor de transmisión de señal *Gas-6* y su receptor tirosina-cinasa (*Sky*), el factor de transcripción *Gata-4* y las proteínas *Zfx* (en hembra) y *Zfy* (en macho). En el ratón la expresión del gen *Vasa* es detectado en las células germinales primordiales después de la colonización de la cresta gonadal y se mantiene hasta la formación de células germinales postmeioticas (Satomi y col., 2000).

e) Morfología del testículo

El testículo es una glándula tubular compuesta que está rodeada por una gruesa capa fibrosa, la túnica albugínea. En la cara posterior del órgano hay un engrosamiento de tejido conjuntivo que penetra en la glándula y forma el mediastino del testículo. Unos delgados tabiques fibrosos llamados los septula testis se extienden radialmente a partir del mediastino hasta la túnica albugínea y dividen el órgano en unos 200 compartimentos piramidales los lobulillos testiculares. Cada lobulillo está constituido por uno o cuatro túbulos seminíferos sumamente retorcidos, estos túbulos constituyen la porción exocrina del testículo, que es en esencia una glándula citogénica cuyo producto de secreción holocrina está formado por células completas los espermatozoides. En el vértice de cada lobulillo los túbulos seminíferos pasan repentinamente a transformarse en túbulos rectos

que constituyen el primer segmento del sistema de conductos excretores (Bardin y Scherins, 1982).

En la cara interna de la túnica albugínea, el tejido conjuntivo denso cede su lugar a la cara más laxa, provista de numerosos vasos sanguíneos que forman la túnica vascular del testículo. A partir de esta capa un tejido conjuntivo de carácter semejante se extiende hacia dentro para llenar todos los intersticios que hay entre los túbulos seminíferos. Contiene fibroblastos, macrófagos, células cebadas y células mesenquimales perivasculares. Además contiene grupos de células de Leydig que constituyen el tejido endocrino del testículo (Hamilton y Greep, 1975).

El testículo se desarrolla en una fase temprana de la vida embrionaria a partir de la pared dorsal de la cavidad abdominal y más tarde descienden hacia el escroto, llevando cada uno, una evaginación del peritoneo. La túnica propia o vaginal del testículo, la cual constituye la cavidad serosa que rodea el testículo. Está formada por una capa externa parietal y otra interna visceral que se aplica directamente a la túnica albugínea en su cara anterior y lateral. En la cara posterior del testículo, donde los vasos y los nervios penetran en el órgano, la cara visceral se refleja de su superficie y se continúa con la capa parietal. Cuando se abre la capa parietal aparece la túnica visceral que cubre al testículo en forma de una superficie brillante lisa recubierta de mesotelio, que es el remanente del epitelio celómico que en el embrión cubría al primordio gonadal (Brandes, 1974).

2) Espermatogénesis

La espermatogénesis comprende una serie compleja de fenómenos mediante los cuales, las espermatogonias se transforman en espermatozoides, esta función se inicia en la pubertad y continúa hasta la muerte del organismo. Para comprender la espermatogénesis, es importante tener presente que el epitelio seminífero está constituido por (1) una población fija de células de soporte no proliferativas y (2) una población proliferante que se diferencia en gametos masculinos, la cual está formada por células germinales que se mueven lentamente hacia la luz del túbulo seminífero a lo largo de los bordes de las células de Sertoli hasta alcanzar la superficie libre. Al acercarse la pubertad se disponen en la periferia, adyacentes a la membrana basal del túbulo, se multiplican por mitosis y aumentan en número. Las espermatogonias que se originan en etapa fetal a partir de las CGPs se encuentran en el interior de los túbulos seminíferos testiculares.

La espermatogénesis es regulada por las hormonas hipofisarias, folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) además de la testosterona que producen las células de Leydig del testículo (figura 3).

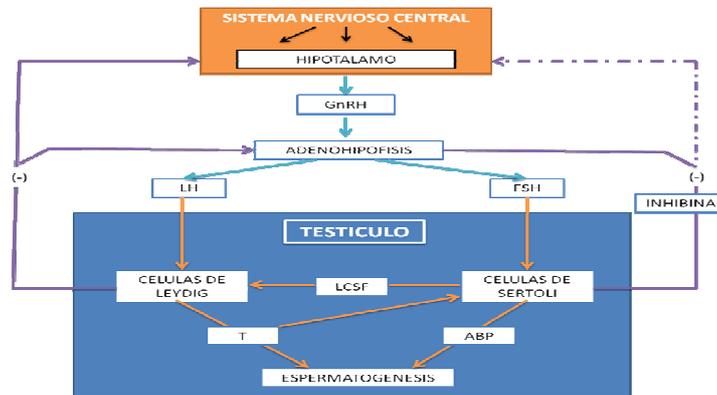


Figura 3. Diagrama del control hormonal de la espermatogénesis. La GnRH actúa sobre la hipófisis para que a su vez libere las gonadotropinas FSH y LH. La FSH actúa indirectamente sobre las espermatogonias, a través de las células de Sertoli. La LH también es conocida como hormona estimulante de células de Leydig; ya que actúa sobre ellas para que secreten testosterona. Las dos hormonas cooperan para mantener el control de la espermatogénesis, la inhibina producida por las células de Sertoli y la testosterona ejercen una regulación negativa en el proceso. GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina, LH: hormona Luteinizante, FSH: hormona folículo estimulante, T: testosterona, ABP: proteína de unión de andrógenos, LCSF: factor estimulante de células de Leydig.

Por conveniencia descriptiva suele dividirse en tres fases principales: en la primera, llamada espermatocitogénesis, las espermatogonias más primitivas (tipo A) proliferan por división mitótica para perpetuarse por sí mismas y dar origen a varias generaciones sucesivas de espermatogonias, cada una de las cuales está un poco más diferenciada que la que le precede. La división de la última generación de espermatogonias (tipo B) da origen a espermatocitos preleptoténicos.

En la segunda fase, llamada meiótica, los espermatocitos sufren dos divisiones de maduración que reducen el número de cromosomas a la mitad (haploides), que producen un grupo de espermátides.

Y finalmente en la tercera fase llamada espermiogénesis, las espermátides sufren una tremenda transformación citológica que las convierte en espermatozoides.

El gen *Cpb-1* codifica una proteína citoplasmática de poliadenilación. Aunque este gen se expresa tanto en los testículos como en los ovarios, los experimentos con RNA

interferente (iRNA), revelan que es necesario para la espermatogénesis, pero no para la ovogénesis. La examinación de la espermateca en individuos hermafroditas revela que el empleo del iRNA para *Cpb-1*, provoca que se acumulen espermatoцитos y muchas de estas células no logran completar la meiosis. Estos resultados sugieren que *Cpb-1* regula la traducción de uno o varios mRNAs que son críticos para la finalización de la meiosis y tal vez otros procesos durante la espermatogénesis (Luitjens y col., 2000).

El gen *lfe-1* codifica un mRNA eIF4E de unión a proteínas que se asocia con gránulos germinales (P) durante la proliferación de la línea germinal. El gen *lfe-1* resulta sensible a la temperatura en la realización de la espermatogénesis, pero la mayoría de los espermatozoides resultantes no son competentes para participar en la fertilización. Alrededor del 80% de hermafroditas tratados con iRNA para *lfe-1* son estériles y el 20% restante han reducido crías. Estos datos sugieren que IFE-1 regula la traducción de mRNA que son esenciales para la espermatogénesis (Amiri y col., 2001).

Espermiogénesis

El término espermiogénesis incluye una serie de fenómenos mediante los cuales las espermátides se transforman en espermatozoides. El primer signo de diferenciación de un componente específico del espermatozoide es la aparición de uno o varios gránulos pequeños dentro del aparato de Golgi. Estos gránulos proacrosómicos son ricos en hidratos de carbono, con micrográficas se observa que cada gránulo se encuentra envuelto en una vesícula limitada por la membrana del aparato de Golgi. A medida que avanza el desarrollo los diferentes gránulos separados de la región del Golgi se fusionan en un glóbulo grande y único el gránulo acrosómico que está contenido dentro de la vacuola o vesícula acrosómica envuelta por una membrana. Esta se adhiere a la cara externa de la envoltura nuclear. El lugar de esta adherencia señala el futuro extremo anterior del núcleo del espermatozoide.

Es conveniente dividir a la espermiogénesis en cuatro fases: en la primera o fase de Golgi, incluye desde la aparición de los gránulos proacrosómicos hasta el desarrollo de un gránulo acrosómico hemisférico unido a la envoltura nuclear.

En la segunda o fase de capuchón, la membrana limitante de la vesícula acrosómica, va aumentando su superficie de contacto con la envoltura nuclear y forma un delgado pliegue que se extiende sobre el polo del núcleo, llegando por último a cubrir toda la superficie

hemisférica anterior en forma de capuchón, el gránulo acrosómico mientras tanto permanece localizado en el polo del núcleo

La tercera o fase acrosómica surge una redistribución de la sustancia del acrosoma, condensación del nucleoplasma y alargamiento de la espermátide. Aunque la mayor parte del acrosoma permanece localizado en el polo anterior del núcleo, durante esta fase de la espermiogénesis se va extendiendo gradualmente una delgada capa dentro de la membrana que constituye el capuchón, hasta que al final coincide en extensión el acrosoma y el capuchón constituyéndose entonces el capuchón acrosómico. El que en su forma definitiva es una estructura en forma de capuchón limitada por una membrana y que contiene una sustancia rica en hidratos de carbono y enzimas hidrolíticas. El núcleo de la espermátida se alarga y se aplanar durante este periodo, su nucleoplasma es granular, fino y uniformemente disperso en finas bandas o filamentos, que posteriormente se acortarán y se engrosarán para formar gránulos densos.

En la cuarta o fase de maduración, ocurren pocos cambios en el acrosoma del espermatozoide de los primates, pero en otras especies continúan experimentando cambios y adquieren gradualmente la forma característica de la especie. Los gránulos densos del núcleo condensados se hacen todavía más gruesos, aumentan su tamaño a expensas de los espacios interpuestos hasta que por último se fusionan y el nucléolo se transforma en una masa densa y homogénea desprovista de una subestructura apreciable. Cuando se ha alcanzado el núcleo, toma una forma periforme y aplanada característica de la cabeza de los espermatozoides. Los errores de la condensación del nucleoplasma aparecen como áreas blancas de forma y tamaño variable, observables con el microscopio de luz en forma de vacuolas nucleares.

Mientras están en marcha las fases iniciales de la formación del acrosoma, en el polo anterior al núcleo, los centriolos emigran al extremo opuesto de la espermátide, aquí el centriolo distal se orienta perpendicularmente a la superficie de la célula y da origen a un delgado flagelo que crece hacia afuera a través de una fisura extracelular entre la espermátide y la célula de Sertoli. A medida que el núcleo inicia su alargamiento y condensación, el par de centriolos y la base del flagelo se separan de la superficie y se aplican al extremo caudal del núcleo. Al mismo tiempo se producen microtúbulos citoplasmáticos que se asocian lateralmente para formar una estructura cilíndrica llamada manguito, que se extiende caudalmente desde una especialización anular de la membrana celular localizada en el borde posterior del capuchón acrosómico. Aunado a la aparición del manguito, ocurre un notable alargamiento de la espermátide de tal manera

que la masa fundamental del citoplasma se desplaza atrás del polo caudal del núcleo donde rodea a la parte proximal del flagelo.

El flagelo en este momento está constituido solo por el complejo filamentoso axial o axonema con dos microtúbulos centrales y nueve dobletes periféricos, estos últimos son continuación de la pared del centriolo distal. El centriolo ésta rodeado por un anillo de material denso filamentoso o granular. Esta estructura anular era llamada el centriolo anular, ya que se creía que se originaba por una división desigual de uno de los centriolos. Este anillo laxo está íntimamente asociado con otro anillo denso más pequeño que se origina en forma de una especialización local de la cara interna de la membrana plasmática, en el punto en que esta última se refleja desde el cuerpo celular hacia el flagelo. En la diferenciación de la cola se forman nueve columnas segmentadas orientadas longitudinalmente en torno a los centriolos. Estas se unen entre sí proximalmente y en la base del núcleo para contribuir a la pieza de conexión. Distalmente los nueve elementos estructurales que forman la pieza de conexión, se reúnen en nueve fibras densas longitudinales que se desarrollan inmediatamente por fuera de los dobletes del axonema. El centriolo distal y el anillo mayor que previamente lo había rodeado desaparecen gradualmente a medida que se van desarrollando la pieza de conexión y las fibras externas de la cola. El anillo denso más pequeño fijado a la membrana flagelar persiste y en el alargamiento de la cola se desplaza distalmente varios micrómetros. A medida que se mueve el manguito desaparece y las mitocondrias se reúnen en torno al segmento del flagelo situado entre el anillo y el núcleo, y se van disponiendo helicoidalmente para completar así la diferenciación de la pieza intermedia.

Tipos celulares presentes en el testículo

Células mioides

Uno de los tres tipos de células que se originan de las células que migran desde el mesonefros a la gónada masculina son las precursoras de las células mioides peritubulares. Éstas forman una sola capa de células aplanadas que rodean a las células de Sertoli, las cuales circunscriben los cordones testiculares. Se sugiere que tienen dos funciones principales: 1) contribuir a la formación estructural de los cordones del testículo en relación con las células de Sertoli y 2) promover el movimiento de los espermatozoides maduros a través de la túbulos seminíferos de los testículos de adultos para la exportación hacia las vesículas seminales, una función mediada por su carácter de músculo liso (Dym y Fawcett, 1971).

Las células miodes peritubulares representan el único tipo celular en el testículo que hasta la fecha no se ha identificado de contrapartida en el ovario. Esto puede ser debido a su origen de migración de células del mesonefros, que sólo se lleva a cabo en gónadas XY después de la expresión del gen *Sry* (Capel y col., 1999; Martineau y col., 1997).

Células de Sertoli

La configuración tridimensional de estas células es extraordinariamente compleja, pero pueden imaginarse esencialmente cilíndricas apoyadas sobre la lamina basal y extendida hacia arriba a lo largo de todo el espesor del epitelio sobre su superficie libre. De la porción axial cilíndrica de estas células irradia un sistema complejo de delgadas prolongaciones laterales, que rodea a las células espermatogénicas y que ocupa todos los intersticios que existen entre ellas (Gilula y col., 1976).

Al microscopio de luz la parte basal de las células de Sertoli tienen una forma poligonal muy delineada. Las micrografías electrónicas muestran que hay pares de membranas adosadas en el límite entre las células de Sertoli vecinas y entre estas últimas y las células germinales. El núcleo de las células de Sertoli es por lo general ovoide pero puede tener uno o más profundos plegamientos en su superficie. Mide aproximadamente de 9 a 12 μm , presenta un nucleoplasma relativamente homogéneo, posee un nucléolo grande y muy característico, formado por un cuerpo central redondo u oval flanqueado por dos masas basófilas redondas. En las micrografías electrónicas se confirma la estructura tripartita de este complejo. El elemento central está formado por un típico nucleolonema organizado en torno a un área central homogénea de densidad relativamente baja.

El citoplasma contiene numerosas mitocondrias alargadas y finas orientadas con frecuencia paralelamente al eje mayor de la célula, hay numerosas inclusiones lipídicas, el complejo de Golgi es grande pero no muestra signos morfológicos de participación en actividades secretoras. El sistema lisosómico muestra diversos componentes que van desde lisosomas primarios esféricos y rodeados de membrana, lisosomas secundarios densos y pleomórficos, hasta conglomerados grandes e irregulares.

Las células de Sertoli proporcionan apoyo mecánico y protección a las células germinales en desarrollo y participan en su nutrición. Parecen desempeñar también un papel activo en la liberación de espermatozoides maduros, nunca se ha observado a las células de Sertoli en división en el testículo maduro, son resistentes al calor, a la radiación ionizante y a diferentes agentes tóxicos.

Células de Leydig

Las células de Leydig fueron descritas por primera vez por Franz Leydig en 1850 (Leydig, 1850), pero tomó más de 50 años antes de que Bouin y Ancel demostraran con animales criptorquídicos que estas células secretan una hormona que juega un papel esencial en el establecimiento y mantenimiento de las características sexuales secundarias masculinas (Bouin y Ancel, 1903). Las células de Leydig a menudo se encuentran en grupos cerca de los vasos sanguíneos, de acuerdo con su función androgénica. En los mamíferos se han descrito dos tipos de células de Leydig: células de Leydig fetales, que se originan de la última parte del mesonefros, y son responsables de la producción de andrógenos para la masculinización del feto (Johnson y Neaves, 1981). En adultos las células de Leydig se diferencian después del nacimiento y parecen no estar relacionadas con las homólogas fetales. Estudios indican que surgen de células precursoras indiferenciadas que forman parte de las células mesenquimales del intersticio (De Kretser y Kerr, 1994; Hardy *y col.*, 1993).

Espermatogonias A

Este tipo celular tiene un núcleo esférico elipsoidal con muy pocos gránulos de cromatina y uno o dos nucléolos de forma irregular, adheridos a la cara interna de la envoltura nuclear. El citoplasma es homogéneo y pálido. En algunas espermatogonias de este tipo el nucleoplasma es oscuro, con una gran vacuola nuclear pálidamente teñida (Fawcett, 1994).

Las espermatogonias tipo Aund (indiferenciadas), sufren una serie de divisiones mitóticas que dan origen a los diferentes tipos celulares; espermatogonias As, Apr y Aal. El primer tipo celular llamado célula madre o espermatogonia madre; es una espermatogonia indiferenciada (Aund). Las espermatogonias (As) "single", la cual se caracteriza por no tener puentes celulares con otras espermatogonias. Después de la primera división y las posteriores generaciones permanecen conectadas por puentes intercelulares. El resultado de la primera división es la diferenciación de la célula madre a una espermatogonia par (Apr) "pair". Las siguientes divisiones de 4, 8 y 16 células se les llama Aal "aligned" o alineada. Los subsecuentes tipos celulares descritos en ratones y ratas siguen el patrón de las espermatogonias primitivas y se diferencian en espermatogonias A (A1, A2, A3 y A4) así como espermatogonias (AIn) intermedias y espermatogonias tipo B, las cuales dan origen a los espermatocitos primarios en preleptoteno.

De esta descendencia, algunas permanecen como células madre para futuros ciclos de renovación de las espermatogonias y para la espermatocinogénesis.

Después de la división del núcleo (cariocinesis), la división de cuerpo celular (citocinesis) es incompleta y las células hijas permanecen unidas, conectadas por puentes citoplasmáticos en el lugar donde el surco de división se encuentra con los restos del huso. Tales puentes aparecen como estructuras transitorias en la mitosis de las células somáticas, pero en el epitelio seminífero permanecen después de la disolución del huso en forma de puentes comunicantes entre las células hijas (Dym y Fawcett, 1971).

Espermatogonias tipo B

Presentan un núcleo esférico que contiene gránulos de cromatina de tamaño variado, muchos de los cuales se distribuyen a lo largo de la envoltura nuclear, el nucléolo único está situado centralmente y a menudo tienen gránulos de cromatina asociados con él (Dym y Fawcett, 1971). El citoplasma no difiere con el de las espermatogonias tipo A (Fawcett, 1994).

Espermatocitos primarios

Estas células son muy parecidas al principio por su tamaño y características citológicas a las espermatogonias de las cuales se originan, pero a medida que se separan de la lámina basal del epitelio germinal van acumulando más citoplasma y se hacen claramente mayores. Casi inmediatamente después del nacimiento los espermatocitos entran en la profase de la primera división de maduración. La cromatina se organiza en cromosomas filamentosos finos característicos del estadio leptoténico de la meiosis I. Los cromosomas homólogos que se han duplicado durante la interfase precedente sufren un emparejamiento íntimo durante el estadio zigoténico por medio de la formación de complejos sinaptonémicos. A causa de su grosor mayor y de su tinción más intensa los cromosomas emparejados de este estadio aparecen más claramente dibujados que los del estadio leptoténico. Cuando se completa el emparejamiento los cromosomas para formar los bivalentes o tétradas continúa el proceso de enrollamiento y acortamiento con lo que se forman controles cromosómicos más gruesos y más patentes típicos del estadio paquiténico. En esta fase los cromosomas duplicados pueden observarse ya como diadas o cromátidas hermanas que se mantienen unidas por centrómeros. Cada elemento paquiténico está formado por cuatro cromátidas. Es también en esta fase cuando tiene lugar la recombinación en la cual las regiones correspondientes de las cromátidas de los

cromosomas emparejados se intercambian mutuamente. Durante la fase siguiente, el estadio diploténico, los cromosomas completan su proceso de acortamiento y desaparecen los complejos sinaptonémicos. Estos estadios de la profase meiótica son extremadamente largos y duran aproximadamente 22 días. Por esta razón, pueden verse en los cortes transversales de los túbulos seminíferos un gran número de espermatocitos en los diferentes estadios de la profase. Al final de la profase desaparece la membrana nuclear, las tétradas o bivalentes se disponen en la placa ecuatorial de la metafase I. En la anafase I los centrómeros de cada par homólogo se desplazan hacia los polos opuestos del espermatocito llevando con ellos a ambas cromátidas (diadas). Esto es completamente distinto de lo que ocurre en la mitosis durante la cual los cromosomas duplicados se alinean en la placa ecuatorial y los centrómeros se dividen enviando una copia de cada cromosoma a cada uno de los polos opuestos. Los cromosomas que se separan en la meiosis son también singulares por el hecho de que difieren tanto de los cromosomas maternos como de los paternos en razón de los intercambios que han tenido lugar durante la recombinación. La anafase I y la telofase I se terminan rápidamente con lo que resulta la formación de espermatocitos secundarios.

Espermatocitos secundarios

Los espermatocitos secundarios contienen solo la mitad del número de cromosomas presentes al principio. Puesto que los cromosomas están duplicados, los espermatocitos secundarios permanecen en la interfase muy poco tiempo por eso se les encuentra sólo raras veces en los cortes de los túbulos seminíferos. Los espermatocitos secundarios realizan rápidamente la segunda fase de la división meiótica con una breve profase II, seguida de una metafase II en la que los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial. La anafase II se diferencia de a la anafase I en que los centrómeros se dividen tal como ocurre en la mitosis y permite así que las cromátidas hermanas se desplacen cada una hacia los polos opuestos. Al terminar la meiosis en la telofase II se forman espermátides que tienen una dotación haploide de cromosoma.

Espermátides

Cada espermátide es relativamente pequeña esférica o poligonal que resulta de la división de los espermatocitos secundarios, tienen un núcleo de 5 a 6 μm de diámetro, de cromatina finamente granular y teñida pálidamente. Puede verse un pequeño aparato de Golgi en su citoplasma yuxtannuclear (Dym y Fawcett, 1971).

Espermatozoide

El espermatozoide maduro es una célula activamente móvil que nada libremente y que está constituida por una cabeza que contiene el núcleo dotado de los rasgos genéticos que el padre podrá transmitir a su descendencia y una cola o flagelo que le proporciona la motilidad que ayuda al traslado del espermatozoide hasta el lugar de fecundación y que se asegura que se oriente adecuadamente para penetrar las cubiertas del ovocito.

El acrosoma es un organelo de forma de capuchón envuelto en una membrana que se adapta estrechamente a los contornos de la parte anterior aguda del núcleo del espermatozoide. La membrana acrosómica interna la que esta adherida a la envoltura nuclear continua en el margen posterior al capuchón con la membrana acrosómica externa. Las dos membranas corren paralelamente y rodean una cavidad estrecha que está ocupada por un material amorfo y homogéneo el contenido acrosómico rico en enzimas. El núcleo del espermatozoide maduro de los mamíferos es normalmente denso y homogéneo en las micrografías electrónicas.

El cuello: esta por detrás de la cabeza, esta es la pieza de conexión. Esta tiene un denso capitel adaptado a la fosa de implantación a la que está adherida. Extendiéndose hacia atrás a partir de este capitel hay nueve columnas segmentadas de 1 a 1.5 μm de largo que se continúan en sus extremos caudales con las nueve fibras externas densas del flagelo del esperma. En el interior de la pieza de conexión inmediatamente por debajo de la superficie articular del capitel hay un centriolo proximal orientado transversalmente. Los tripletes de microtúbulos de la pared centriolar están incluidos en grado variable en el material denso que compone la superficie articular y las columnas segmentadas de la pieza de conexión. Falta de ordinario en los espermatozoides maduros el centriolo distal orientado según el eje del flagelo del esperma, pero residuos de sus nueve tripletes pueden estar unidos a la cara interna de las columnas segmentadas. El par central de microtúbulos del axonema flagelar puede llegar por delante hasta el interior de la pieza de conexión incluso hasta el centriolo proximal. En la región del cuello y por fuera de la pieza de conexión pueden encontrarse una o dos mitocondrias orientadas longitudinalmente que a veces emiten unas prolongaciones que se extienden entre las columnas segmentadas.

La pieza intermedia: En el eje del flagelo esta el axonema formado por dos microtúbulos centrales únicos rodeados por nueve dobletes regularmente distribuidos que forman un conjunto llamado ordinariamente en la formula (9+2). Este complejo microtubular se extiende sin cambios significativos en su estructura a lo largo de toda la cola desde el

cuello hasta cerca de la punta de la pieza terminal. El flagelo de los espermatozoides se diferencia de otros flagelos porque su axonema (nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central) rodeado por las fibras externas densas (9 cilindros proteicos uno por cada doblete) que intervienen en el movimiento del flagelo. La pieza intermedia se caracteriza por una vaina mitocondrial orientada circularmente y dispuestas extremo con extremo para formar una espiral cerrada.

La pieza principal: Esta mide unos 45 μm de longitudinal y es de 0.5 μm de grosor en la base pero se ve adelgazado progresivamente hacia la pieza terminal. Tienen una vaina fibrosa muy característica: cuando se le estudia con el microscopio electrónico, esta vaina aparece constituida por dos columnas continuas ventral y dorsal, conectadas por unas costillas espaciadas regularmente que se extiende circularmente por cada mitad de la vaina y se continua por sus extremos con las columnas longitudinalmente: en los cortes transversales de la pieza principal se aprecia que las fibras externas densas 3 y 8 terminan a corta distancia un poco más allá del anillo. A partir de su terminación se alargan los bordes internos aguzados de las columnas ventral y dorsal de la vaina para ocupar la posición de estas fibras y se unen a un reborde que sobresale radialmente de los dobletes 3 y 8 del axonema.

La pieza terminal: La vaina fibrosa termina repetidamente a unos 5 a 7 μm del extremo del flagelo. La porción terminal más allá de este punto está formada por el axonema recubierto solo por la membrana flagelar.

3) GENERALIDADES DE MURCIELAGOS

Artibeus jamaicensis



Orden: Chiroptera

Suborden: Microchiroptera

Superfamilia: Phyllostomoidea

Familia: Phyllostomidae

Subfamilia: Stenodermatinae

Género: Artibeus

Subgénero: Artibeus

Especie: ***Artibeus jamaicensis***

(Leach, 1821)

Murciélago zapotero

Características generales:

Es una especie frugívora, se considera un murciélago de tamaño mediano con una variación morfológica considerable. La diferencia más notable de *A. jamaicensis* es poseer dos líneas faciales blancas y tenues, el dorso es de color grisáceo y el vientre pálido marrón (Jones, 1978). En general, las orejas son anchas y triangulares en la punta. La hoja nasal está bien desarrollada con un grupo de glándulas sebáceas (Dalquest y col., 1952). El labio inferior tiene una verruga central con pequeñas verrugas alrededor. La longitud del antebrazo de 52-67.4 mm, las alas son anchas y de color gris oscuro.

El cráneo de *A. jamaicensis* es corto y robusto con importantes procesos preorbital y postorbital, la cresta sagital es moderadamente desarrollada; porción posterior del hueso temporal es cóncava con impresiones musculares; incisivo superior interno es pequeño, los dientes molares son fuertes con grandes superficies de trituración (Davis, 1970; Goodwin y Greenhall, 1961).

Medidas somáticas:

Los rangos de las medidas en mm, son: 78-89; longitud de pata trasera 16-18 mm; longitud de la oreja, 20-27 ; longitud del antebrazo, de herradura, 8.7-9.0; longitud del cráneo el 26,2-31,6; longitud cóndilobasal 27.8-30.0; ancho cigomático 16.2-20.6, constricción postorbital, 6.7-7.3; amplitud de la caja craneana 12.0-12.9; profundidad de cráneo 9.1-10.3; anchura mastoidea 13.9-14.7, extensión de los maxilares postpalatal

longitud 7.7-8.7, longitud del paladar 8.8-11.0; longitud por anchura postpalatal 7.7-8.7, longitud del paladar 8.8-11.0 (Handley 1966; Jones, 1978; Genoways 1979 y Hall, 1981).

Hábitat y Distribución:

Se distribuye en México desde Sinaloa a Tamaulipas, hacia el sur va desde Ecuador, Venezuela, Trinidad, Tobago, Antillas Mayores y Menores, Cayos de Florida y Brasil y en el noroeste de Argentina (Fig. 4) (Mares y col.,1981; Myers y Wetzel, 1983; Redford y Eisenberg, 1992). Se distribuye desde el nivel del mar hasta los 2.135 m (Eisenberg 1989; Tamsitt 1966). Su hábitat es tropical: bosques lluviosos, bosque de niebla y bosques arbustivos. Este se refugia en troncos huecos, cuevas, en el follaje de los árboles pero también se ha encontrado en carpas construidas en hojas de *Araceae* y palmas.

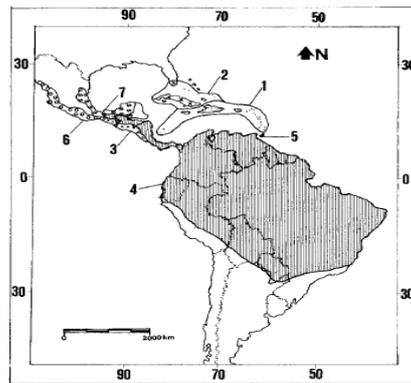


Figura 4. Distribución geográfica de *Artibeus jamaicensis* (Ortega y Castro-Arellano, 2001).

Alimentación:

Como todos los murciélagos neotropicales, este es nocturno. Se alimenta de frutas, entre las cuales incluye higos (*Ficus*), guarumos (*Cecropia* sp.), guayabas (*Psidium guajaba*), papaya (*Carica papaya*), zapotes y plátanos. En épocas en que estos son difíciles de conseguir también puede alimentarse de néctar, polen, hojas, flores e insectos. Durante las noches puede volar entre 10 y 15 kilómetros en busca de alimento.

Patrón reproductivo

Tiene un patrón de reproducción bimodal poliéstrico, con picos de producción de crías, probablemente relacionados con la disponibilidad de frutas (Heithaus y col., 1975). Cada hembra tiene dos periodos de celo posparto y produce anualmente una cría o, en raras ocasiones gemelos (Barlow y Tamsitt, 1968) en cada parto. El pico de cría se produce al final de la temporada de lluvias y el parto se produce durante los meses secos. En la

época de reproducción, las hembras pueden mostrar retraso en el desarrollo embrionario (período de 2,5 meses), y las crías son nacidas en el siguiente período de cría (Fleming, 1971). *Artibeus jamaicensis* en México presentan crías durante todo el año, muchas hembras lactantes han sido capturados con embriones en diferentes momentos del año (Hall y Dalquest 1963; Jones y col. 1972, 1973). La gestación normal es de 3.5 a 4 meses, pero puede extenderse a 7 meses con retraso en el desarrollo embrionario (Wilson y col., 1991). Los embriones alcanzan el estadio de blastocisto antes de entrar en el útero. La implantación es intersticial y la placenta es discoidal y hemocorial (Bleier, 1979). Al final de la gestación, la masa de una hembra preñada es 35% más que de una hembra no preñada (Keast y Handley, 1991).

Los espermatozoides de *A. jamaicensis* se asemejan a los de *Glossophaga soricina* en la morfología y el tamaño. Cada espermatozoide tiene una pequeña y redondeada cabeza casi circular de 4.28 a 4.65 μm , longitud y de ancho 3.16 y 3.44 μm ; longitud del acrosoma 2.51 a 2.98 μm ; longitud nuclear 3.35 a 4.00. Carece de cuello, la pieza media es relativamente corta y se estrecha gradualmente hacia la cola que es de 8.23 a 8.32 μm . La longitud de los testículos es de 3.5 a 10.0 mm. (Forman y Genoways, 1979).

Estatus de conservación:

La longevidad máxima del murciélago de la fruta *A. jamaicensis* es de 9 años (Gardner y col. 1991). Este murciélago no está en ninguna lista de la conservación (Arita y Ceballos, 1997). La mayoría de los informes lo consideran como común a abundante en hábitats perturbados y sin molestias a lo largo de su distribución (Fenton y col., 1992). *Artibeus j.* se considera destructivo para los cultivos de frutas en algunas regiones (Goodwin, 1970).



Figura 5. Escala de conservación *Artibeus jamaicensis*.

Sturnira lilium



Orden: Chiroptera
Suborden: Microchiroptera
Superfamilia: Phyllostomoidea
Familia: Phyllostomidae
Subfamilia: Stenodermatinae
Género: *Sturnira*
Subgénero: *Sturnira*
Especie: ***Sturnira lilium***
(Geoffroy, 1810)
Murciélago de charreteras

Características generales:

Es una especie frugívora, considerada de tamaño medio de 62 a 65 mm de longitud; antebrazo de 36.6 a 45 mm (Hall, 1981). La membrana interfemorale es reducida y con flecos de pelo, la hoja nasal es corta y amplia, las orejas son pequeñas y se caracteriza por tener el dorso de gris oscuro a marrón rojizo, la cabeza, cuello y hombros son más amarillentos; los pelos son bicolores con puntas color marrón oscuro y el fondo amarillento. El vientre es más pálido que el dorso y el patagio es de color marrón. El uropatagio es reducido con pelo abundante y se presenta al borde interior de las extremidades posteriores. Las patas son musculosas, bastante peludas sobre el borde interno y escasamente velludas sobre las rodillas y la membrana alar, contigua. Los antebrazos son tenuemente velludos en las superficies superior e inferior.

La mayoría de los machos poseen en los hombros glándulas que producen un característico color amarillento o rojizo manchado, que aparecen como charreteras. Las glándulas de los machos tienen un fuerte y dulce olor almizclado que pueden tener alguna función cuando los individuos están reproductivamente activos. La presencia o ausencia de estas glándulas puede ser correlacionado con la madurez reproductiva, estado reproductivo, o la temporada de cría, y son generalmente ausentes en los juveniles.

Hábitat y Distribución:

Sturnira lilium, habita en bosques y selvas tropicales de tipo caducifolio y siempre verdes, además de comunidades vegetales propias de zonas áridas y por lo general seleccionan

áreas abiertas, también habita en cuevas, túneles y puentes. Está ampliamente distribuido, va desde el noroeste de México (Sonora) a través de Centroamérica hacia América del Sur, al norte de Argentina y Uruguay, también en las Antillas Menores al norte de Dominica y en Trinidad. De las seis subespecies reconocidas, cuatro están aisladas geográficamente en las Antillas Pequeñas. *S. lilium* tiene una amplia distribución, que se produce en Trinidad y se conoce en todas las naciones de América del Sur, excepto en Chile. En México es de distribución amplia, está presente en la vertiente Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas y por la vertiente del Golfo de México desde Tamaulipas hasta la península de Yucatán (Fig. 6).

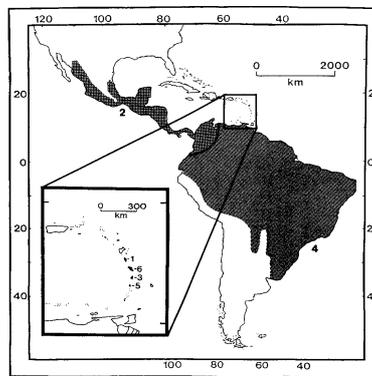


Figura 6. Distribución geográfica de *S. lilium* (Hall, 1981 and Koopman, 1982).

Alimentación:

Sturnira lilium se alimenta de una gran variedad de frutas, así como de insectos y polen, sin embargo dietas específicas no han sido bien documentadas (Gardner, 1977). Se alimenta de *Solanaceas*, *Piperaceas* y *Moraceas*, siendo probablemente el murciélago más oportunista, ya que se alimenta de lo que está disponible en el momento, por ejemplo en Argentina se alimentan de la fruta de la palmera (*Phoenix*) y se sienten muy atraídos por los plátanos (*Musa* Villa-R. y col. 1969, 1971) y en Sonora por los higos silvestres (*Ficus*) (Cockrum, 1963). Ruschi (1953) reportó por Yucatán una dieta rica en frutas y en insectos.

Patrón reproductor:

Este murciélago exhibe un patrón reproductivo poliestro bimodal (Fleming y col., 1972), que reproduce dos veces al año, una vez en la estación seca y otra en la temporada de lluvias. También hay un patrón bimodal de picos de embarazo y la lactancia, pero el embarazo se ha registrado en todos los meses del año (Nowak, 1991). Se han reportado

picos de actividad reproductiva en tres períodos durante todo el año, generalmente de febrero hasta junio, octubre y diciembre (Fleming y col., 1972). La longitud exacta de la gestación se desconoce, en otros filostómidos la duración es de cuatro a siete meses (Grzimek, 1990). Las hembras dan a luz una cría, pero los nacimientos se producen dos veces al año, una vez hacia el final de la estación seca y una vez en la temporada de lluvias de mediana a tardía (Stoner, 2001). Los biólogos debaten si este patrón estacional de parto se desencadena por la disponibilidad de alimentos o señales de temperatura (Mello y col., 2008). Las crías nacen con gran desarrollo de las extremidades traseras, los ojos abiertos. Se tarda 5 a 20 semanas para destetar a los jóvenes. Filostómidos jóvenes tienden a ser independientes 1 mes después del nacimiento. Los jóvenes alcanzan la madurez sexual o reproductiva a los 8-11 meses de edad (Fleming y col. 1972; Gannon y col., 1989).

Los espermatozoides de *S. lilium* poseen grandes cabezas son relativamente estrechos y ovalados. El acrosoma es grande, simétrico, y más corto que el núcleo. El núcleo es ovalado y el ápice ampliamente redondeado, la base es muy estrecha. (Forman y Genoways, 1979).

Estatus de conservación:

Sturnira lilium es un murciélago que tolera y adapta a la deforestación en comparación con otras especies. Es la especie de murciélagos más abundante en áreas de barbecho. La deforestación es una preocupación, sin embargo, debido a su preferencia por posarse en gran diámetro (Evelyn y Stiles, 2003), en cambio este murciélago no está en la Lista Roja de la IUCN (the red list of threatened species), EE.UU.



Figura 7. Escala de conservación de *Sturnira lilium*.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis se encuentran bien caracterizados en la mayoría de los mamíferos como eventos continuos y sincronizados. Sin embargo, en algunas especies como los murciélagos, las adaptaciones al medio ambiente han llevado a modificaciones en la conducta reproductiva y por ende a cambios en la fisiología testicular.

V. HIPÓTESIS

En base al conocimiento de los procesos reproductivos descritos para algunos mamíferos como el humano, el ratón y la rata. Y su semejanza con los murciélagos filostómidos, se espera que haya un proceso de auto renovación de la línea germinal del epitelio seminífero de los testículos de machos adultos de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*.

VI. OBJETIVOS :

a) Objetivo general:

Identificar los diferentes tipos celulares que conforman el ciclo del epitelio seminífero de las dos especies de murciélagos.

b) Objetivos particulares:

- i) Analizar la presencia de células progenitoras de espermatocitos (espermatogonias), en el testículo de murciélagos adultos.
- ii) Determinar por inmunofluorescencia la presencia de células progenitoras de espermatocitos empleando marcadores descritos para ellas en otros mamíferos (C-KIT, OCT-4 y VASA).
- iii) Analizar la proliferación de las células progenitoras detectando las actividades: mitótica y meiótica, con los marcadores H3 y SCP1, respectivamente.
- iv) Examinar la reactividad y especificidad de los anticuerpos contra C-KIT, OCT-4, VASA, WT-1 y H3 por "Western blot" en las dos especies de murciélagos.

VII) MATERIAL Y MÉTODOS

1) Colecta

La colecta de los machos adultos de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*, se llevó a cabo en el Municipio de Yautepec, Morelos, cuya localización geográfica es 18° 55'53" de latitud norte y 99° 01'15" de longitud con una altura a nivel del mar de 1,282 metros.

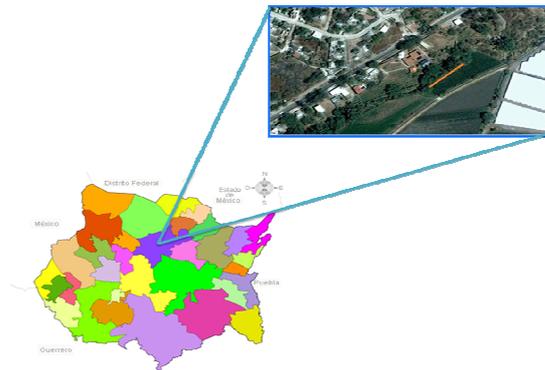


Figura 8. Localización geográfica del estado de Morelos, municipio de Yautepec.

Esta localidad tiene una temperatura anual promedio de 21.7°C. La precipitación pluvial promedio anual es de 945.7 milímetros. La flora está constituida principalmente por: selva baja caducifolia, de clima cálido, jacaranda, tabachín, casahuate, ceiba y bugambilia. La fauna la constituyen: venado cola blanca, jabalí de collar, mapache, tejón, zorrillo, armadillo, liebre, conejo común, coyote, gato montés, comadreja, cacomixtle, tlacuache y murciélago, pájaro bandera, chachalaca, urraca copetona, zopilote, aura, cuervos, lechuza y aves canoras y de ornato. (<http://yautepecmorelos.mx.tripod.com>).

Para su colecta se utilizaron redes niebla, que fueron colocadas entre la vegetación, cauces de ríos y brechas. Y con la autorización otorgada por la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SGPA/DGVS/04141/07).

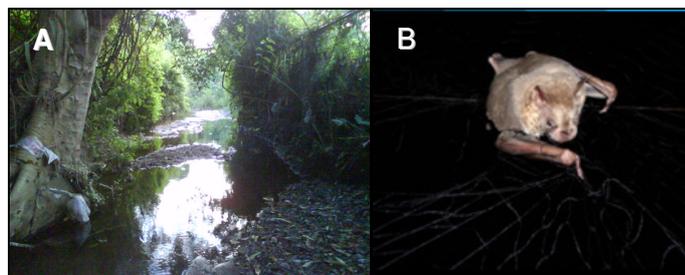


Figura 9. Puntos de colecta A) En el cauce del río. B) Colecta con redes de niebla.

Posteriormente los murciélagos fueron transportados al Instituto de Biología donde eran mantenidos en cautiverio en jaulas en el bioterio del Departamento de Zoología. Los murciélagos eran alimentados con frutas tropicales como papaya, plátano, mango y manzana e hidratados con agua. La temperatura del lugar se mantuvo dentro de un intervalo que oscilo entre 25-31°C y una humedad relativa del alrededor 60%.



Figura 10. Cautiverio de murciélagos. (A) Jaulas, (B) Machos *Sturnira lilium*, (C) Machos *A. jamaicensis*.

2) Sacrificio

Se realizaron 7 colectas entre los meses de marzo y octubre de 2009, en los cuales se colecto un total de 29 organismos de los cuales 15 fueron de *Sturnira lilium* y 14 de *Artibeus jamaicensis*. Posteriormente los murciélagos fueron sacrificados en el laboratorio. Cada uno de los cuales fueron inyectados con pentobarbital sódico (20 g./ml) para poderles realizar una perfusión con PBS y paraformaldehído al 4% vía ventrículo izquierdo y así poder fijar el tracto reproductivo, el cual fue extraído y mantenido en una solución PBS 1x para su posterior estudio.

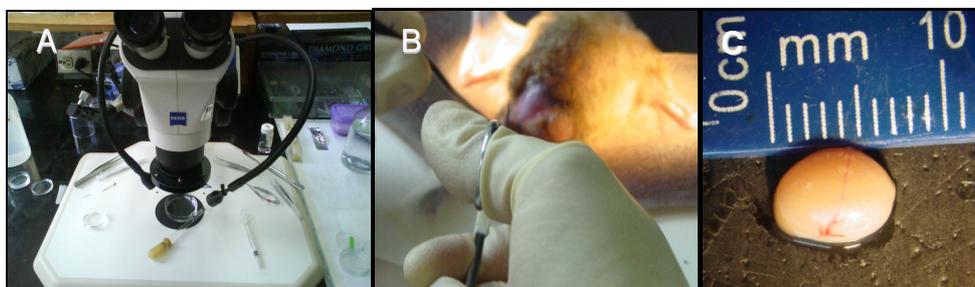


Figura 11. A) Material de disección B) disección del murciélago C) extracción de la muestra.

3) Morfometría testicular macroestructural.

Se estableció el estado reproductivo: activo de los machos adultos de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium* basados en el tamaño testicular y la espermatogénesis completa.

Para la caracterización morfométrica macroestructural se tomó en cuenta el peso de los organismos, el tamaño del antebrazo así como el tamaño de los testículos de ambas especies.

4) Morfometría testicular microestructural.

Para la caracterización morfométrica microestructural, se describió el ciclo del epitelio seminífero y se identificaron los subtipos celulares de espermatogonias madre en ambas especies, se realizó el análisis de los tejidos a nivel de microscopía de luz, los testículos previamente extraídos se fijaron por 2 horas en una solución de Karnovsky (Karnovsky, 1965) sin calcio (pH 7.4), y se colocaron en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio por 1 hora, se postfijaron con tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en amortiguador de Zetterqvist (Zetterqvist, 1956), posteriormente se deshidrataron en alcoholes 70%, 80%, 90%, 96%, 100% (2) durante 10 minutos, en seguida se colocaron 2 veces en acetónitrilo por 20 minutos, después se colocaron en una mezcla 1:1 y 2:1 de epón:acetónitrilo por 1 hora. Y finalmente se incluyeron en epón 812, se realizaron cortes transversales entre 1.5 y 2 μm en un ultra micrótomo Leica EM y se tiñeron con azul de toluidina para su análisis se tomaron imágenes con Axiocam de axio visión R 4.6 de Zeiss axioskop.

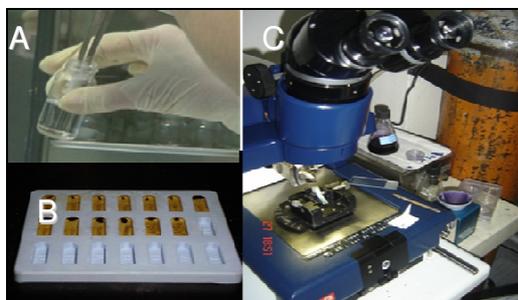


Figura 12. A) Procesamiento de la muestra para microscopía de alta resolución B) muestras incluidas en epón 812. C) cortes al Ultra micrótomo y tinción con azul de toluidina.

Finalmente se analizaron las imágenes para la identificación de las células progenitoras de espermatoцитos y para describir el ciclo del epitelio seminífero. Se identificaron los diferentes tipos y etapas del desarrollo celular que conforman el epitelio: células de Sertoli, espermatogonias, espermatoцитos, espermátides y espermatozoides. Se examinaron un total de 20 túbulos seminíferos por especie, los cuales se eligieron por ser de forma redonda en diferentes cortes, mismos que se les midió el diámetro, se contó el número de células de cada tipo, presentes en los túbulos seminíferos de ambas especies con la ayuda del software UTHSCSA Image Tool V. 2.01 ALPHA de la Universidad de Texas Health Science Center en San Antonio.

5) Inmunohistoquímica

Para la detección de la presencia de células progenitoras de espermatoцитos se utilizaron los marcadores policlonales descritos para otros mamíferos (C-KIT, OCT-4, y VASA), para el análisis de la actividad proliferativa de estas células se detectó la actividad mitótica y meiótica con los marcadores H3 y SCP1 respectivamente. También se utilizó Wt-1 que es un factor de transcripción en la determinación y diferenciación sexual. Y MIS como un factor de crecimiento y diferenciación sexual. Los marcadores fueron localizados mediante la expresión de la proteína de estos factores por inmunofluorescencia. Para esto, los testículos de *S. lilium* y *A. jamaicensis* se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 20 minutos y se incubaron toda la noche en una solución amortiguadora de sacarosa a 4 °C. Posteriormente se incluyeron en capsulas been con TISSUE TEK y se cortaron al criostato secciones de 10-12 µm de grosor de cada una de las muestras, mismas que se trataron con tritón X-100 al 1% en PBS por 10 min, se lavaron con PBS y se bloquearon con albúmina al 1% en PBS durante 2 h. Los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios, anti: C-KIT dilución 1: 200, OCT-4 1: 250, VASA 1: 500, MIS 1: 250, WT-1 1: 100, SCP1 1: 250 y H3 1: 200 durante toda la noche. Después se hicieron 4 lavados con PBS y se bloquearon nuevamente con albumina por 15 minutos y posteriormente fueron incubados con anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo (CY5, RODAMINA y FITC) y específicos para cada anticuerpo primario durante 1 hora. Finalmente se hicieron lavados con PBS. Los cortes se montaron con una solución (Dako) en porta objetos con poli L-lisina y finalmente fueron observados al microscopio confocal (LSM 5 Pascal, Zeiss)

equipado con láser de Argon-Krypton y Helium-Neon, y filtros BP 450-490 y 546/12 (rodamina-Cy3) y LP 650 (Cy5).



Figura 13. A) Inclusión de las muestras en "tissue tek". B) Cortes de las muestras al criostato C) Laminillas al vacío. D) Laminillas incubadas con anticuerpos.

6) Tinción Coomasie.

Para la identificación de las proteínas, se realizó un perfil electroforético. Para lo cual se hizo la extracción de proteínas a ambos testículos de cada especie. Los testículos fueron macerados a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con $100\text{ }\mu\text{l}$ de amortiguador RIPA y $5\text{ }\mu\text{l}$ de inhibidores de proteasas, posteriormente se incubaron 20 minutos en hielo, inmediatamente se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm y se obtuvo el sobrenadante y el precipitado. Después se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida-bisacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) al 7.5% y 15% respectivamente (Laemmli, 1970). Se corrió a 120 Volts aproximadamente por 2 horas. Posteriormente se realizó la tinción del gel con azul Coomasie, durante 30 minutos. Y finalmente se usó una solución desteñidora para poder observar las proteínas de interés.

7) "Western blot"

Se realizaron los "blots" para determinar la especificidad y reactividad de los anticuerpos policlonales para C-KIT, OCT-4, VASA, WT-1 y H3.

Se realizó la extracción de proteínas a los testículos de 3 organismos de cada especie, ambos testículos fueron macerados a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con $100\text{ }\mu\text{l}$ de búfer RIPA y $5\text{ }\mu\text{l}$ de inhibidores de proteasas, posteriormente se incubaron 20 minutos en hielo,

inmediatamente se centrifugó por 15 minutos a 12000 revoluciones y finalmente se obtuvo el sobrenadante y el precipitado. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry modificado. Después se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida-bisacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) al 7.5 % (C-KIT, OCT-4, VASA) y 15 % (WT-1 y H3) respectivamente y de acuerdo a Laemmli, 1970. Se corrió a 120 Volts aproximadamente por 2 horas.

Se transfirió en membranas PVDF con la ayuda del "transblot" a 400 mA por 40 minutos, las membranas fueron bloqueadas con PBS BSA al 3 % e incubadas toda la noche con anticuerpos primarios (C-KIT, OCT-4, VASA, WT-1 y H3) respectivamente. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS tween y un lavado con PBS 1x cada uno de 5 minutos para que se pudieran incubar con anticuerpo secundario anticonejo por 1 hora, después se realizaron 2 lavados con PBS tween y un lavado con PBS 1x para su revelado con tetracloruro de diaminobenzidina (DAB) y se detuvo la reacción con agua.



Figura 14. A) Electroforesis B) Transferencia a membranas PVDF C) incubación con anticuerpos D) revelado con DAB.

VIII) RESULTADOS

1) Morfología macroestructural del testículo de *Artibeus jamaicensis*.

De un total de 14 machos adultos de *Artibeus jamaicensis* se caracterizó los aspectos generales en la morfología macroestructural y se determinó su estado reproductivo activo: los testículos se encontraron localizados en la base del pene (A), por otra parte en el estado inactivo se encontraron inguinales.

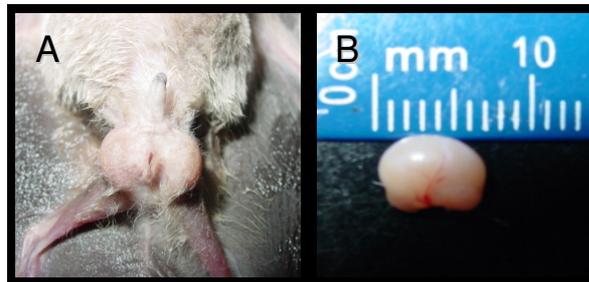


Figura 15. Morfología general de *Artibeus jamaicensis*. A) Estado reproductivo activo B) Testículo extraído posterior a la perfusión.

Respecto al peso de los organismos, estos presentaron un intervalo de 31.4 - 48.03 g. con un promedio de 36.15 gramos y en la longitud del antebrazo mostró un intervalo de 5.2 cm – 5.6 cm. y con un promedio de 5.3 centímetros e independientes a su estado reproductivo (Oliveira y col. 2009). En cambio el tamaño promedio de los testículos fue de 0.5 cm. Y el diámetro promedio de los túbulos seminíferos fue de 123 μm estimado con *Image tool V2.01*.

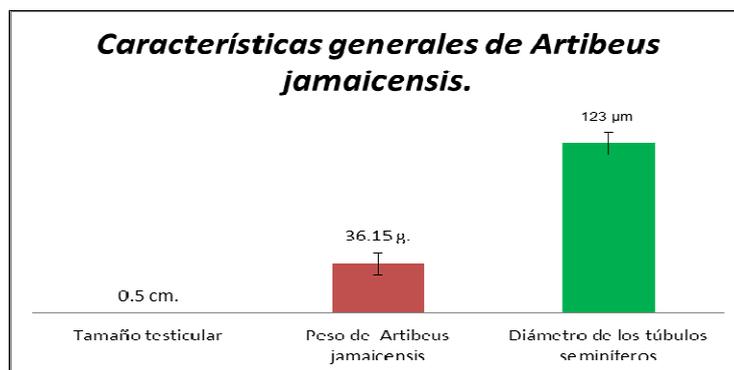


Figura 16. Características generales de los organismos colectados de *Artibeus jamaicensis*. Peso promedio de 36. 15 gramos. B) tamaño promedio de los testículos 0.5 cm. C) diámetro de los túbulos seminíferos de 123 μm .

2) Morfología microestructural del testículo de *Artibeus jamaicensis*.

Entre los aspectos generales de la morfología microestructural podemos apreciar un patrón típico en el arreglo del epitelio seminífero de mamíferos como el ratón y la rata. En *Artibeus jamaicensis*, está conformado por túbulos seminíferos (**t**), que están rodeados por una lamina propia ó membrana basal (**MB**) que consta de dos hojas interna y externa con fibras de colágena, así como las asociaciones celulares de la línea germinal espermatogonias (**SG**) (tipo A, intermedias y tipo B), espermatocitos primarios, secundarios, espermátides redondas (**ESr**), elongadas y espermatozoides (**EZ**) en el lumen del túbulo. Por otra parte la línea somática está caracterizada por las células de Sertoli que sirven de soporte, nutrición y forman la barrera hematotesticular. En el intersticio se observan células de Leydig (**LC**), figura 17.

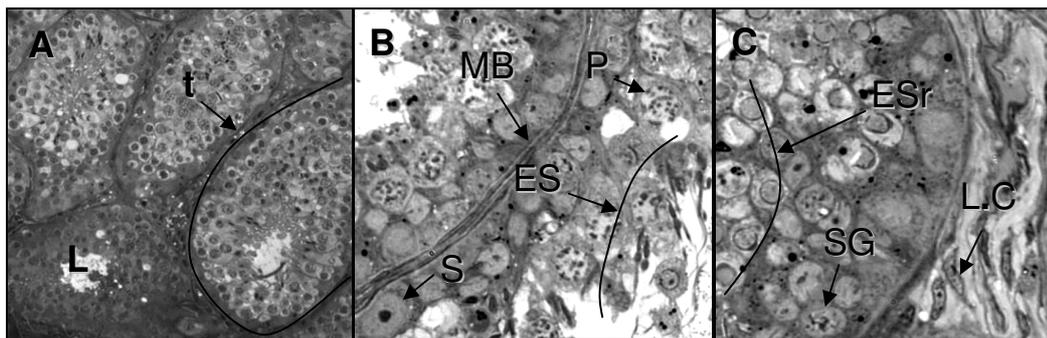


Figura 17. Microfotografía de testículo de *Artibeus jamaicensis* teñidas con azul de toluidina. (A) Corte semi-fino a una amplificación de 10X, donde se observan los túbulos seminíferos (t), el lumen del túbulo (L). B) Amplificación a 40X, donde se localizan las células de Sertoli (S) en la membrana basal (MB) del túbulo. Espermatocitos en paquiteno (P) y espermátides alargadas en diferentes etapas de desarrollo (ES). C) A una amplificación de 40X, se observan espermátogonias (SG), espermátides redondas en diferentes etapas de la formación acrosomal (ESr) y células de Leydig (L.C.) en el intersticio.

a) Cuantificación de los diferentes tipos celulares encontrados en el epitelio seminífero de *Artibeus jamaicensis*.

Con base a lo establecido en el ciclo del epitelio seminífero de la rata (Clermont, 1972) y al diagrama ilustrado descrito por Dym y Clermont en 1970, sobre el ciclo de la rata el cual comprende de XIV etapas y 19 estadios de la espermiogénesis. Se realizó el conteo de los diferentes tipos celulares que se encuentran en el epitelio seminífero de *Artibeus jamaicensis* se identificaron: células de Sertoli, espermátogonias, espermatocitos

primarios, secundarios; espermatides redondas, alargadas y espermatozoides en el lumen tubular, (figura 18). Se examinaron un total de 20 túbulos seminíferos, los cuales se eligieron por ser de forma redonda en diferentes cortes, se contó el número de células presentes para cada tipo en los túbulos seminíferos con la ayuda del software UTHSCSA Image Tool V. 2.01 ALPHA de la Universidad de Texas Health Science Center en San Antonio.

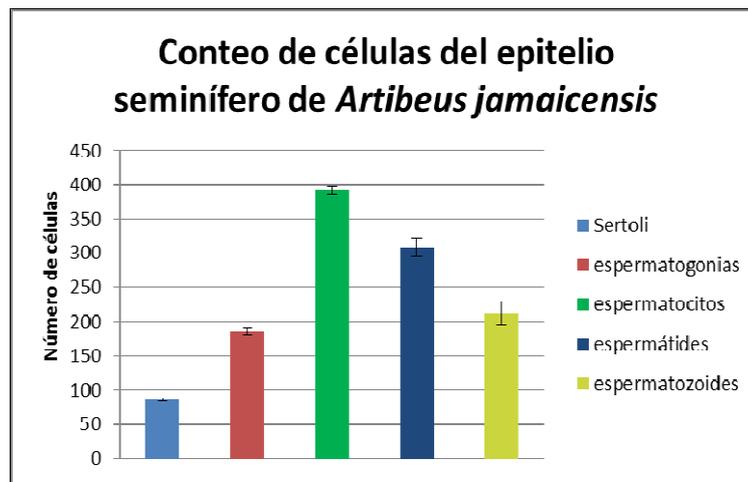


Figura 18. Número de células encontradas en 20 túbulos del epitelio seminífero de *Artibeus jamaicensis*.

b) Identificación de espermatogonias en *Artibeus jamaicensis*.

La descripción de las espermatogonias se realizó con base a las características nucleares de las espermatogonias de ratón y rata de acuerdo a lo descrito por: Chiarini y Meistrich en 2008 y Chiarini y Russell en 2001.

Las espermatogonias inician el proceso de espermatogénesis, mediante divisiones mitóticas. Para lo cual se describieron los diferentes tipos celulares; el primer tipo celular llamado célula madre o espermatogonia madre; es una espermatogonia indiferenciada (Aund), las cuales se clasificaron como (As) "single" por no tener puentes celulares con otras espermatogonias. Después de la primera división y las posteriores generaciones permanecen conectadas por puentes intercelulares. El resultado de la primera división es la diferenciación de la célula madre a una espermatogonia par (Apr). Las siguientes divisiones de 4, 8 y 16 células se les llama Aal "aligned" o alineada. Los subsecuentes

tipos celulares descritos en ratones y ratas siguen el patrón de las espermatogonias primitivas y se diferencian en espermatogonias A (A1, A2, A3 y A4) así como espermatogonias (AIn) intermedias y espermatogonias tipo B. Que darán paso al proceso de espermatogénesis con la formación de espermatocitos primarios, secundarios, espermátides redondas, alargadas y finalmente a la formación de espermatozoides.

Espermatogonias indiferenciadas (Aund).

Las espermatogonias indiferenciadas As, Apr y Aal, originaran a las espermatogonias A1, que presentan diferentes morfologías (figura 19). Las espermatogonias Apr tienen un núcleo pronunciado con forma ovalada de un aspecto moteado que le da la heterocromatina y eucromatina. Tiene uno o dos nucléolos. Las espermatogonias Aal se tienen un núcleo con forma ovalada. La heterocromatina y la eucromatina se encuentran en todo el núcleo dándole un aspecto moteado.

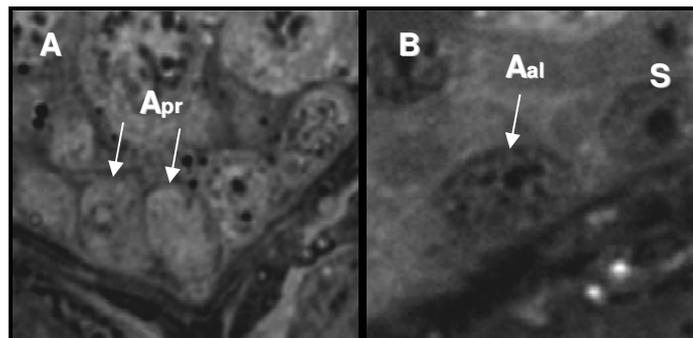


Figura 19. Espermatogonias indiferenciadas de *Artibeus jamaicensis*. A) espermatogonia Apr (Apr). B) Espermatogonia Aal y célula de Sertoli (S) en la base del túbulo a 40x.

Espermatogonia A1.

Las espermatogonias A1 tienen un núcleo largo y oval, ligeramente más redondo que las espermatogonias indiferenciadas. Presenta 3 nucléolos muy teñidos, figura 20.

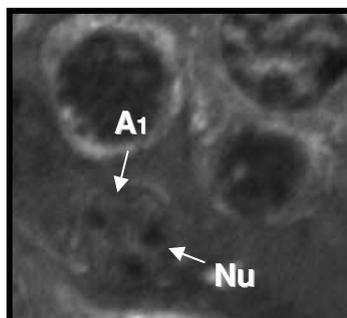


Figura 20. Espermatogonia A1, la cual presenta 3 nucléolos (Nu), a 40x.

Espermatogonia A2.

Las espermatogonias A2 tienen un núcleo oval que presenta pequeños cúmulos de heterocromatina en un 10 %. El nucléolo es pequeño y compacto. La eucromatina es finamente moteada en el núcleo (figura 21).

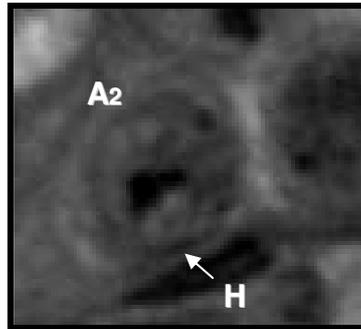


Figura 21. Espermatogonia A2 donde se muestran los cúmulos de heterocromatina (H) en la envoltura nuclear, a 40x.

Espermatogonia A3.

Las espermatogonias A3 presentan un núcleo más redondeado y alrededor de un 25 % de la envoltura nuclear se encuentra bordeada por heterocromatina. La eucromatina presenta un ligero incremento que le da un aspecto moteado al núcleo (figura 22).

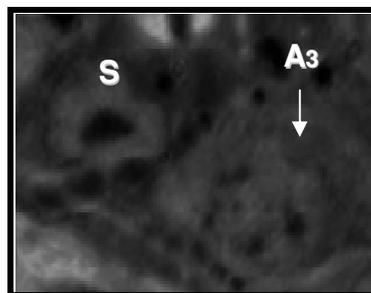


Figura 22. Espermatogonia A3 en la base del túbulo seminífero, a 40x.

Espermatogonia A4.

Las espermatogonias A4 tienen un núcleo de forma oval a redonda que presentan hasta un 70 % más de heterocromatina. La eucromatina es similar que en A3. Se pueden observar mas de 3 nucléolos (figura 23).

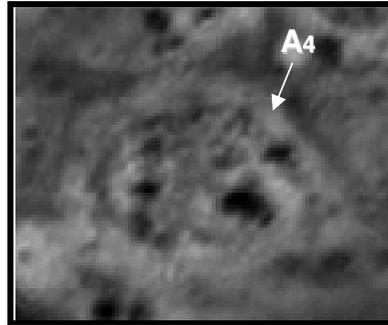


Figura 23. Espermatogonia A4 donde se muestran los cúmulos de heterocromatina en la envoltura nuclear, a 40x.

Espermatogonia intermedia (In).

Las espermatogonias Intermedias (In) tienen un núcleo con forma oval. Uno o dos nucléolos compactos. La heterocromatina bordea al núcleo en un 70 a 100 %. El área de la eucromatina es ligeramente mayor que en las espermatogonias A4 (figura 24).

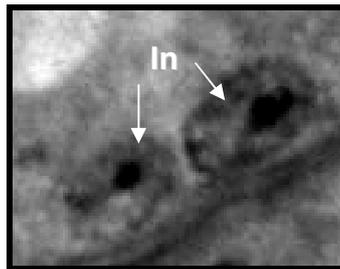


Figura 24. Espermatogonias intermedias (In), a 40 x.

Espermatogonia tipo B.

El núcleo de las espermatogonias tipo B está teñido intensamente, tiene una forma más redonda. El nucleolo es pequeño, compacto y muy teñido. La eucromatina es homogénea y fina. La heterocromatina se ve menos en la membrana nuclear como se muestra en la figura 25.

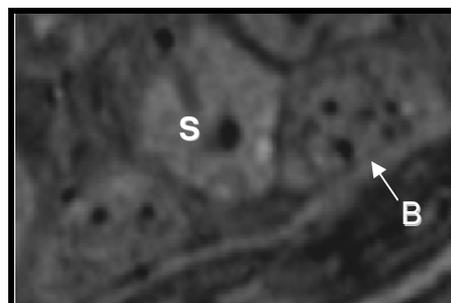


Figura 25. Espermatogonia tipo B (B) y célula de Sertoli (S) en la base del túbulo seminífero.

c) Ciclo del epitelio seminífero de *Artibeus jamaicensis*.

En el ciclo del epitelio seminífero se identificaron las características cualitativas de las XIV etapas del ciclo y los 19 estadios de la espermiogénesis en base a la formación acrosomal de acuerdo a lo descrito por Hess en el ciclo del epitelio seminífero de rata 1990. Y al diagrama ilustrado de Dym y Clermont (1970) en el ciclo del epitelio seminífero de la rata, que comprende de XIV etapas y 19 estadios de la espermiogénesis.

Para la identificación de las espermatogonias tipo A indiferenciadas (A und), A1, A2, A3, A4, A intermedia (A In) y espermatogonias tipo B en base a lo descrito por Chiarini y Meistrich en 2008.

Se identificaron las XIV etapas (Hess, 1990) del ciclo del epitelio seminífero, así como los 19 estadios o pasos de la espermiogénesis la cual está dividida en 4 fases (Golgi, Cap, Acrosoma y Maduración). A continuación se describe el ciclo del epitelio seminífero mencionando sus características más importantes de cada etapa.

La espermatogénesis en mamíferos es un proceso continuo de diferenciación celular que comprende 3 fases: fase de proliferación mitótica, fase meiótica y la espermiogénesis. Entre las características generales de la anatomía microscópica del testículo de murciélago se observa la túnica albugínea parte más externa de los testículos así como un arreglo característico en túbulos y cordones seminíferos. La membrana basal está constituida por dos capas, interna y externa, llamada lámina propia en la que se encuentran fibras de colágena llamadas células miodes. En lo que respecta al epitelio seminífero se encuentran dos líneas celulares, las células sustentaculares de Sertoli que se encuentran desde la lámina propia hasta la luz del túbulo seminífero. Contienen un núcleo claro y un nucléolo muy característicos. Las células de Sertoli además de ser el soporte se encargan de la nutrición y forman la barrera hematotesticular. Por otra parte las células germinales están constituidas por espermatogonias de tipo A1 – A4, intermedias y tipo B, espermatocitos primarios, secundarios, espermátides redondas, alargadas y espermatozoides. Se encuentran espermatocitos primarios en preleptoteno que son los más pequeños de 7.5 a 8.2 μm presentan áreas localizadas de heterocromatina esparcidas por todo el núcleo y ocasionalmente de cerca de la membrana nuclear presentes en las etapas VII y VIII. La cromatina restante está dispersa y en forma homogénea pero densamente granular; leptoteno se caracteriza por presentar finos filamentos longitudinales en el núcleo la cromatina es homogénea y granular pero más condensada de tamaño de 8 a 10 μm se observan en las etapas IX, X, XI; zigoteno

se presentan en las etapas XII y XIII tienen un diámetro de 10 a 12 μm . Se caracteriza por la presencia de segmentos cortos de complejos sinaptonémicos; paquiteno los autosomas están apareados por los complejos sinaptonémicos, presentes en las etapas I a XII; Diploteno en el núcleo se observan segmentos de cromatina muy condensados y un nucléolo prominente en la etapa XIII y diacinesis desaparición de la envoltura nuclear, los cromosomas se desplazan a los extremos en la etapa XIV. Los espermatoцитos secundarios son pequeños con su núcleo esférico y agregados de cromatina. Los cuales llevan a cabo la meiosis II que conducen a la formación de espermatozoides: el proceso llamado espermiogénesis que consta de 4 fases Golgi: empieza con la aparición de espermátides redondas estadio I donde el aparato de Golgi está desprovisto de gránulos; estadio II se observan dos o tres gránulos en Golgi, los cuales darán inicio al estadio III en la cual en granulo está en la vesícula acrosomal. Estadio IV la membrana de la vesícula se adhiere a la envoltura nuclear. Durante la fase Golgi el núcleo es esférico, grande y claro.

Fase de casquete o Cap comprende los estadios V VI y VII. En la cual la membrana limitante de la vesícula acrosómica aumenta su zona de adherencia a la envoltura nuclear, formando un delgado pliegue o arco sobre el núcleo (estadio V). El estadio VI desaparece el aparato de Golgi es sustituido por una vesícula arco se extiende de un cuarto a un tercio sobre el núcleo. En el estadio VII la extensión lateral cubre de un tercio a la mitad del núcleo, los centriolos se mueven al polo abacrosomal del núcleo y se forma el flagelo.

La fase acrosomal se inicia en el estadio VIII y termina en el estadio XI. Esta etapa de forma el acrosoma. Inicia cuando las espermátides se orientan hacia la membrana basal y comienza la elongación del nucleó y durante esta el sistema acrosomal se extiende para cubrir la superficie dorsal y apical del núcleo. En el núcleo la cromatina se condensa formando grumos densamente empaquetados, el núcleo empieza a aplanarse y deja de ser redondo para volverse ovoide. Simultáneamente se alarga la espermátide.

Fase de maduración: las espermátides tienen forma de bala y crece el flagelo y las mitocondrias se acomodan en su parte proximal, el citoplasma se elimina en gran parte originando la gota citoplasmática que se separa formando el cuerpo residual. El proceso de maduración termina con la espermiación o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero.

En el ciclo del epitelio seminífero se identificaron las XIV etapas del ciclo y los 19 estadios de la espermiogénesis se mencionan las características más importantes:

Etapa I. Se caracteriza por la presencia de espermatogonias tipo (A), espermatocitos primarios en paquiteno (P), espermátide redonda en estadio 1 de desarrollo (ES1), donde se observa el aparato de Golgi desprovisto de gránulos. Espermátides alargadas en estadio 15 de diferenciación (ES15) y espermatocitos secundarios (SS), figura 26.

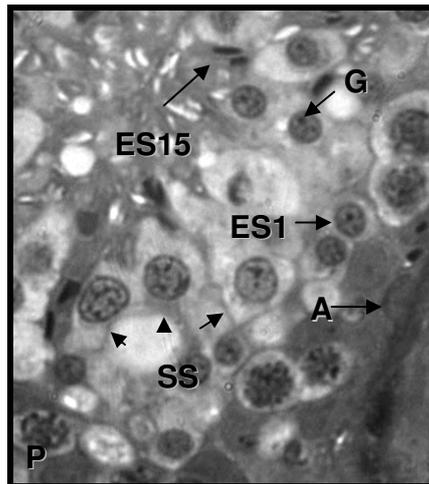


Figura 26. Espermatogonia tipo (A), espermatocitos en paquiteno (P), espermátide redonda en estadio 1 de desarrollo (ES1), espermátides alargadas en estadio 15 de diferenciación (ES15) y espermatocitos secundarios (SS), a 40 x.

Etapa II. Se encuentran espermatogonias intermedias (In) que dan paso a espermatogonias tipo (B), espermatocitos en paquiteno (P), en las espermátides redondas aparece la vesícula proacrosomal que se caracteriza por pequeños gránulos proacrosómicos en estadio 2 (ES2), que empiezan a moverse al lumen y espermátides en estadio 16 de diferenciación (ES16), figura 27.

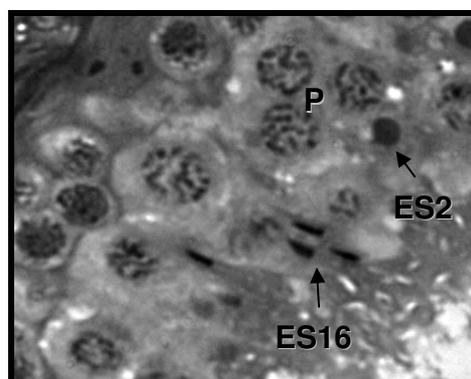


Figura 27. Espermatocitos en paquiteno (P), espermátides redondas en estadio 2 (ES2) que empiezan a moverse al lumen y espermátides en estadio 16 de diferenciación (ES16), a 40 x.

Etapa III. Se observa un gránulo acrosómico largo rodeado por una vesícula acrosomal clara es la espermátides estadio 3 (ES3). El aparato de Golgi forma un arco teñido (ar) sobre la formación acrosomal. Espermátogonias Intermedias, espermátocitos en paquíteno (P), espermátides en estadio 17 de diferenciación (ES17) y espermatozoides (EZ), figura 28.

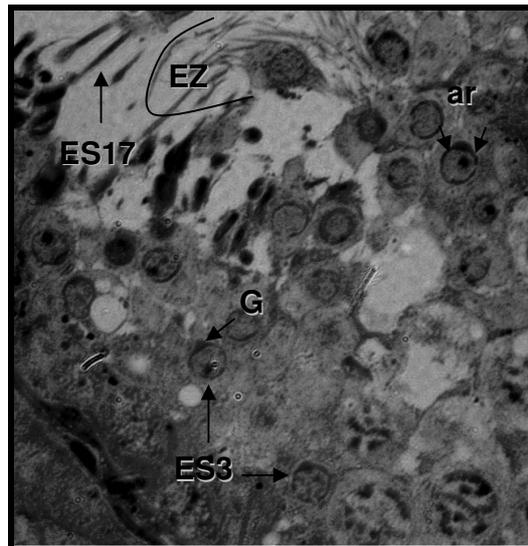


Figura 28. Espermátides en estadio 3 (ES3), espermátocitos en paquíteno (P), espermátides en estadio 17 de diferenciación (ES17) y espermatozoides (EZ), a 40x.

Etapa IV. Se observan espermatogonias A y B, espermátocitos en paquíteno (P), en Espermátides estadio 4 de diferenciación (ES4), la vesícula acrosómica se pega a la membrana nuclear. El aparato de Golgi (G) forma un arco intensamente teñido (ar), figura 29.

Etapa V. Se observan espermatogonias A y B, espermátocitos en paquíteno. Las espermátides en estadio 17 están fuertemente embebidas en el citoplasma de las células de Sertoli. En las espermátides estadio 5 (ES5) el gránulo acrosomal se aplana y en el sistema acrosomal se forman unas delgadas líneas laterales que forman un arco sobre el núcleo, que se observa en la figura 29.

Etapa VI. Se observan espermatogonias A y B, espermátocitos en paquíteno. Las espermátides en estadio 18 empiezan a moverse hacia el lumen. En esta etapa la extensión lateral del sistema acrosomal cubre un tercio a un cuarto del núcleo de la espermátide en estadio 6 (ES6), figura 29.

Etapa VII. Se observan espermatogonias A, espermatocitos en preleptoteno, paquiteno (P), diacinesis (Dia), diploteno (D). Las espermátides estadio 19 se encuentran distribuidas a lo largo de borde luminal con un gránulo basófilo cerca del núcleo. La extensión acrosómica es de un tercio a la mitad del núcleo de las espermátides en estadio 7 (ES7), figura 29.

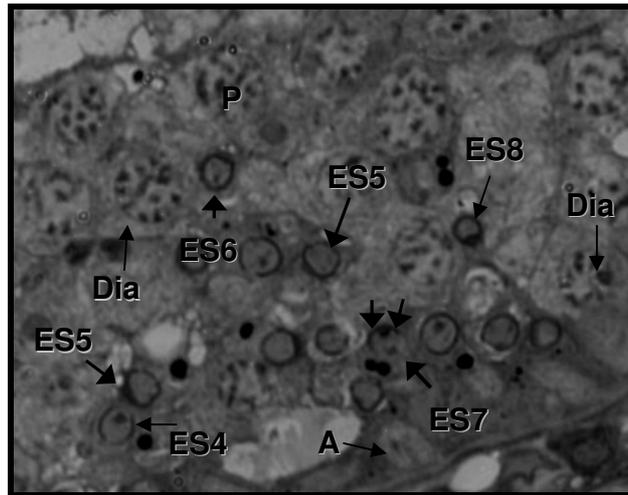


Figura 29. Espermátides en diferentes grados de diferenciación, espermátide en estadio 4 (ES4), 5 (ES5), 6 (ES6), 7 (ES7) y 8 (ES8), donde se puede observar el movimiento de las espermátides hacia la membrana basal. Espermatogonia (A), espermatocitos en paquiteno (P) y diacinesis (Dia), a 40x.

Etapa VIII. Se observan espermatogonias A, espermatocitos en preleptoteno (PL), paquiteno (P) y espermátides en estadio 19 de diferenciación espermatozoides (ES19). El sistema acrosomal de las espermátides en estadio 8 (ES8) están dirigidos a la parte basal, figura 30.

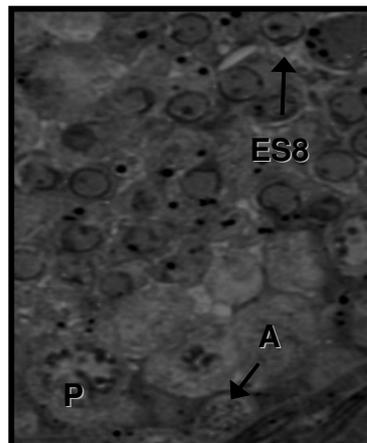


Figura 30. Espermátide en estadio 8 (ES8), el sistema acrosómico está dirigido a la membrana basal. Espermatogonia (A) y espermatocitos en paquiteno (P), a 40 x.

Etapa IX. El núcleo de las espermatídes en estadio 9 están ligeramente alargadas (ES9a), (ES9) inician el proceso de alargamiento. Los cuerpos residuales están distribuidos a lo largo del epitelio seminífero. Se observan espermatogonias A, espermatocitos en leptoteno (L), paquiteno (P). Y células de Leydig en el intersticio (L.C), figura 31.

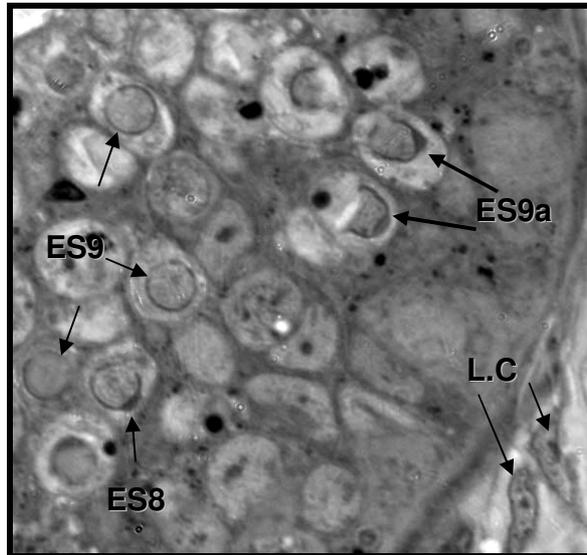


Figura 31. Espermatídes en estadio 9, los núcleos están ligeramente alargados (ES9a), espermatídes (ES9) que inician el proceso de elongación. Se observan células de Leydig en el intersticio (L.C), a 63 x.

Etapa X. El núcleo de las espermatídes en estadio 10 es oblongo y el sistema acrosomal forma el límite de la curvatura ventral se extiende a lo largo de un lado del núcleo (ES10), se observan remanentes de cuerpos residuales, figura 32.

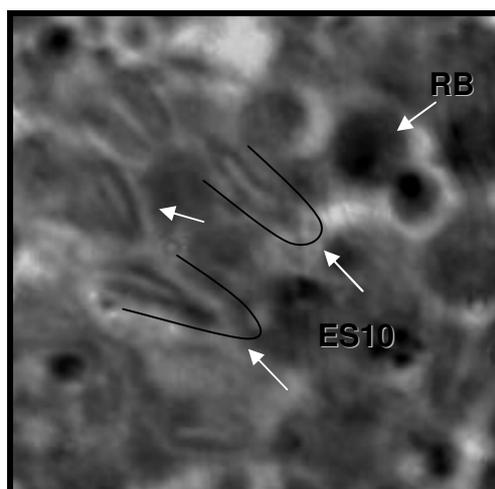


Figura 32. Espermatogonias alargadas (ES10), y cuerpos residuales (RB), a 100x.

Etapa XI. . Se observan espermatogonias A, espermatocitos en leptoteno (L), paquiteno (P). Las espermátides en estadio 11 (ES11), tienen una protuberancia donde se encuentra el sistema acrosómico y el núcleo sobresale en ángulo de la región caudal, figura 33.

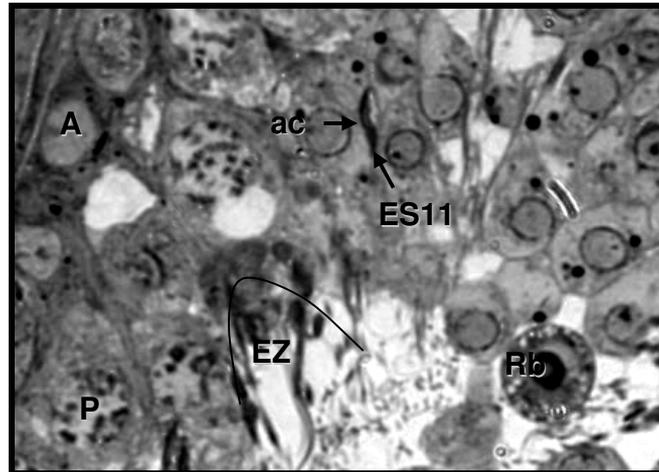


Figura 33. Espermátide (ES11) con una protuberancia donde se encuentra el sistema acrosomal (ac) y el núcleo sobresale en ángulo de la región caudal. Espermatogonia (A), espermatocitos en paquiteno (P) y cuerpo residual (Rb), a 63 x.

Etapa XII. Se observan espermatogonias A, espermatocitos en zigoteno (Z), paquiteno (P). Espermátides en estadio 12 (ES12), se observan cabezas alargadas y estrechas en están condensadas y con puntas romas, figura 34.

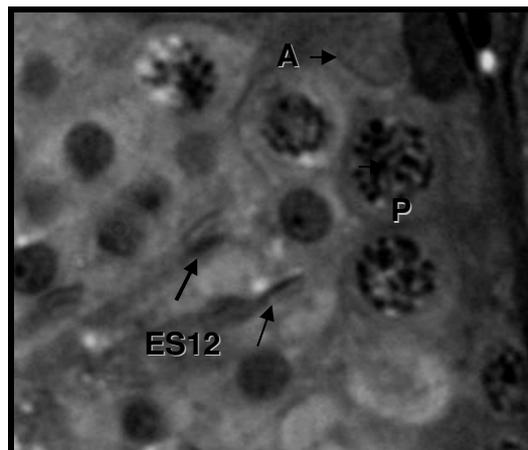


Figura 34. Espermátide estadio 12 (ES12), se observan, cabezas alargadas y estrechas con puntas romas. Espermatogonias A y espermatocitos en paquiteno (P), a 40 x.

Etapa XIII. El núcleo de las espermátides estadio 13 (ES13) tienen la forma de bala ó espátula y están en paquetes separados por espermatocitos en paquiteno (P), zigoteno (Z), diploteno (D), figura 35.

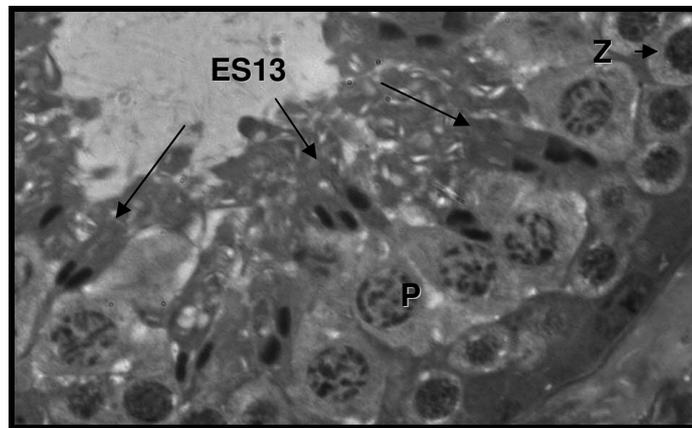


Figura 35. Espermátides en estadio 13 (ES13), el núcleo tiene la forma de bala ó espátula y están en paquetes separados por espermatocitos en paquiteno (P), se observan espermatocitos en zigoteno (Z), a 100x.

Etapa XIV. Se observan espermatocitos secundarios. Espermátocitos primarios en paquiteno (P), zigoteno (Z), diploteno (D), figuras meióticas. Espermatozoides en el lumen del túbulo seminífero (EZ), figura 36.

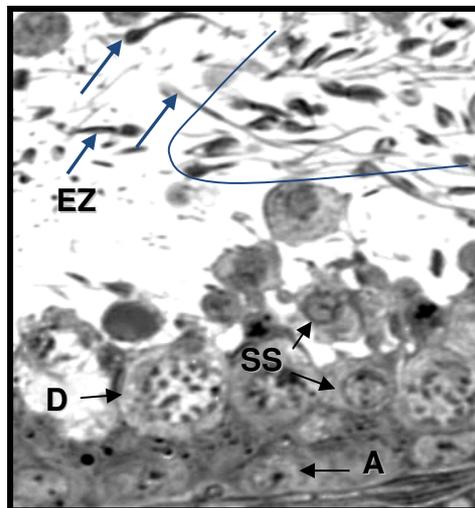


Figura 36. Espermátocitos secundarios (SS), espermatocitos primarios en diploteno (D) y espermatozoides en el lumen del túbulo seminífero (EZ), a 100 x.

3) Morfología macroestructural del testículo de *Sturnira lilium*.

De un total de 15 machos adultos de *Sturnira lilium*, se caracterizó la morfología macroestructural y se determinó su estado reproductivo activo: los testículos se encontraron localizados en la base del pene (A), por otra parte en el estado inactivo se encontraron inguinales.



Figura 37. Morfología general de *Sturnira lilium*. A) estado reproductivo activo. B) testículo extraído.

En cuanto al peso, el promedio fue de 18.95 gramos y un valor promedio en la longitud del antebrazo de 3.8 cm. E independientes a su estado reproductivo (Oliveira y col. 2009). El tamaño promedio de los testículos fue de 0.58 cm. Y respecto al diámetro promedio de los túbulos seminíferos fue de $123 \mu\text{m}$ evaluado con *Image tool V 2.01*.

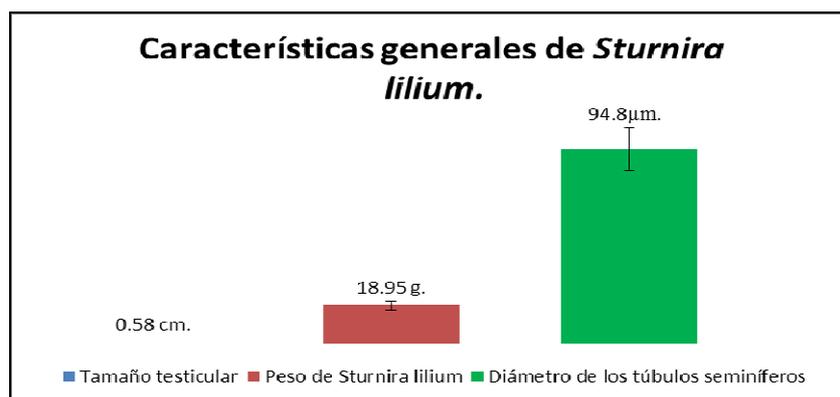


Figura 38. Características generales de los organismos colectados de *Sturnira lilium*. Peso promedio de 18. 95 gramos. B) Tamaño promedio de los testículos 0.58 cm. C) diámetro de los túbulos seminíferos de 94.8 μm .

4) Morfología microestructural del testículo de *Sturnira lilium*.

Entre los aspectos generales en la morfología microestructural podemos apreciar un patrón típico en el arreglo del epitelio seminífero de mamíferos como el ratón y la rata.

En *Sturnira lilium* está conformado por la túnica albugínea (T) en la parte más externa, túbulos seminíferos (t) y cordones (C) que están rodeados por una lámina propia o membrana basal (MB) que consta de dos hojas interna y externa con fibras de colágena, así como las asociaciones celulares de la línea germinal espermatogonias (SG), espermatocitos primarios, secundarios, espermátides redondas (ESr), elongadas y espermatozoides (ES) en el lumen del túbulo. La línea somática está caracterizada por las células de Sertoli (S) que sirven de soporte, nutrición y forman la barrera hematotesticular. Por otra parte se observan células de Leydig (LC) y vasos sanguíneos (V) en el intersticio, figura 39.

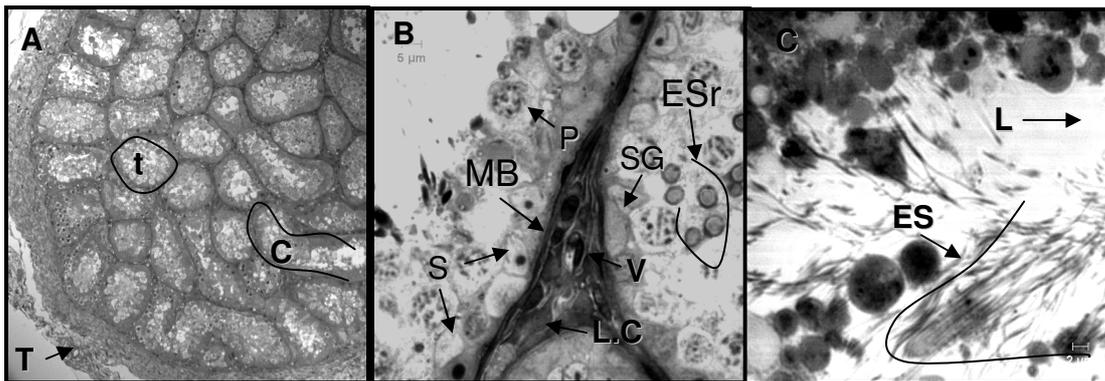


Figura 39. Microfotografía de testículo de *Sturnira lilium* teñidas con azul de toluidina. A) Corte semifino a una amplificación de 10X, donde se observan la morfología testicular general, túnica albugínea (T), túbulos (t) y cordón seminífero (C). B) Mayor amplificación 100X de un cordón seminífero donde se localizan espermatogonias (SG), espermatocitos primarios en paquiteno (P), células de Sertoli (S) en la periferia del cordón, espermátides redondas en diferentes etapas de la formación acrosomal (ESr), vaso sanguíneo (V) y células de Leydig (L.C) en el intersticio. C) A una amplificación de 200X, presencia de espermátides alargadas en diferentes etapas de desarrollo y espermatozoides (ES) en el lumen (L) del cordón seminífero.

d) Cuantificación de los diferentes tipos celulares encontrados en el epitelio seminífero de *Sturnira lilium*.

Con base a lo establecido en el ciclo del epitelio seminífero de la rata descrito por Clermont (1972) y al diagrama ilustrado descrito por Dym y Clermont (1970) sobre el ciclo de la rata el cual comprende de XIV etapas y 19 estadios de la espermiogénesis. Se realizó el conteo de los diferentes tipos celulares que se encuentran en el epitelio

seminífero de *Sturnira lilium* se identificaron: células de Sertoli; espermatogonias; espermatocitos primarios, secundarios; espermatides redondas, alargadas y espermatozoides en el lumen tubular, (figura 40). Se examinaron un total de 20 túbulos seminíferos, los cuales se eligieron por ser de forma redonda en diferentes cortes, se contó el número de células presentes para cada tipo en los túbulos seminíferos con la ayuda del software UTHSCSA Image Tool V. 2.01 ALPHA de la Universidad de Texas Health Science Center en San Antonio.

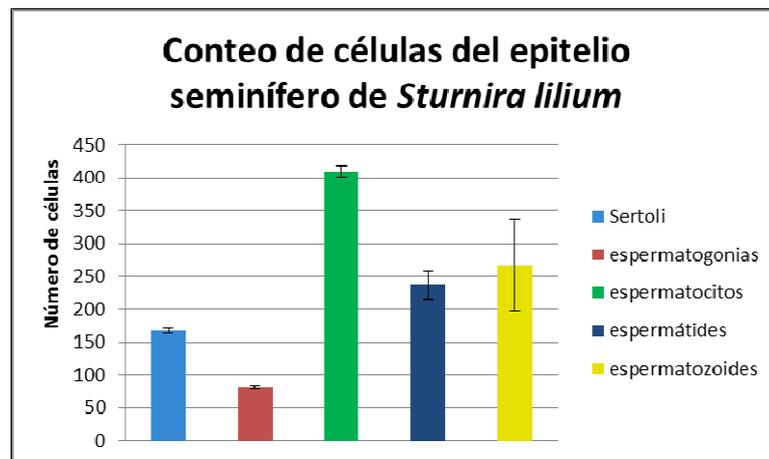


Figura 40. Número de células encontradas en 20 túbulos del epitelio seminífero de *Sturnira lilium*.

e) Identificación de espermatogonias en *Sturnira lilium*.

La descripción de las espermatogonias se realizó con base a las características nucleares de las espermatogonias de ratón y rata de acuerdo a lo descrito por: Chiarini y Meistrich, (2008) y Chiarini y Russell, (2001).

Espermatogonias indiferenciadas (Aund).

Las espermatogonias indiferenciadas As, Apr y Aal hacia espermatogonias A1 presentan diferentes morfologías. Las espermatogonias As “single” tienen un núcleo pronunciado con forma ovalada de un aspecto moteado que le da la heterocromatina y eucromatina, figura 41. Se caracterizan por no tener puentes intercelulares y a su posible autorenovación.

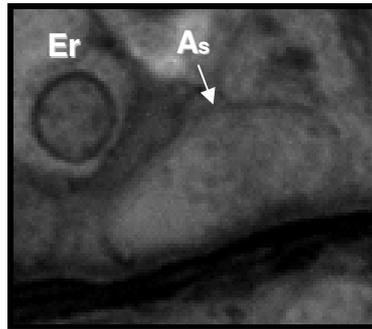


Figura 41. Espermatogonia indiferenciada, espermatogonia A "single" (As) y espermatide redonda (Er), a 100 x.

Espermatogonia A1

Las espermatogonias A1 tienen un núcleo largo y oval, ligeramente más redondo que las espermatogonias indiferenciadas. Presenta 2 o 3 nucléolos muy teñidos en el centro, figura 42.

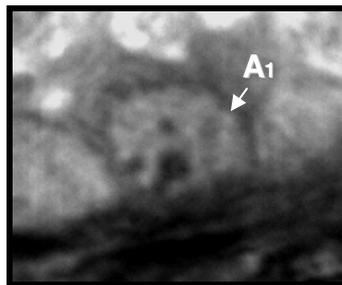


Figura 42. Espermatogonia A1, presenta 2 nucléolos (Nu), a 100 x.

Espermatogonia A2

Las espermatogonias A2 tienen una forma nuclear oval que presenta pequeños cúmulos de heterocromatina en un 10 %. El nucleolo es pequeño y compacto. La eucromatina es finamente moteada en el núcleo, figura 43.

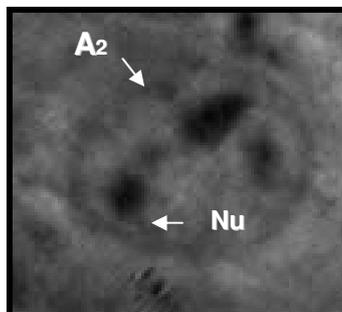


Figura 43. Espermatogonia A2 presenta 1 nucléolo (Nu), a 40 x.

Espermatogonia A3

Las espermatogonias A3 presentan un núcleo más redondeado y alrededor de un 25 % de la envoltura nuclear se encuentra bordeada por heterocromatina. La eucromatina presenta un ligero incremento que le da un aspecto moteado al núcleo, figura 44.

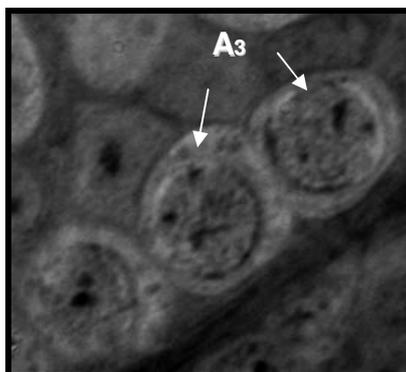


Figura 44. Espermatogonias A3 en la base del túbulo seminífero, a 40x.

Espermatogonia A4

Las espermatogonias A4 tienen núcleo que presenta una forma oval a redonda y presentan hasta un 70 % de heterocromatina en el borde. La eucromatina es similar que en A3. Se pueden observar más de 3 nucléolos, figura 45.

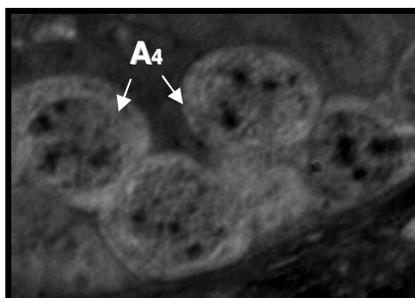


Figura 45. Espermatogonias A4 en la base del túbulo seminífero, a 100 x.

Espermatogonia intermedia (In).

Las espermatogonias Intermedias (In) tienen un núcleo con forma redonda ligeramente oval, con uno o dos nucléolos compactos. La heterocromatina bordea al núcleo entre un 70 a 100 por ciento, figura 46. El área de la eucromatina es ligeramente mayor que en las espermatogonias A4.

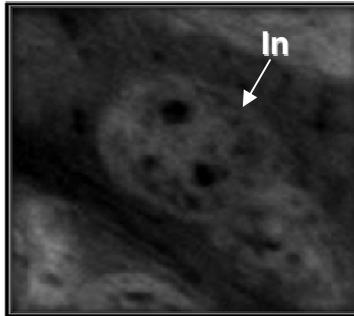


Figura 46. Espermatogonia intermedia (In) en la base del túbulo seminífero, a 40x.

Espermatogonia tipo B.

El núcleo de las espermatogonias tipo B está teñido intensamente, tiene una forma redondeada. El nucleolo es pequeño, compacto y muy teñido. La eucromatina es homogénea y fina. La heterocromatina se ve menos en la membrana nuclear, figura 47.

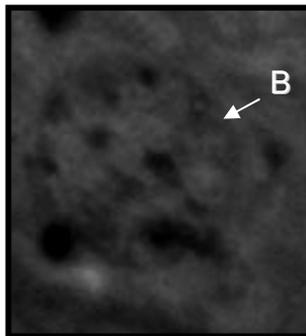


Figura 47. Espermatogonia tipo B (B) en la base del túbulo seminífero, a 100 x.

f) Ciclo del epitelio seminífero de *Sturnira lilium*.

En el ciclo del epitelio seminífero se identificaron las características cualitativas de las XIV etapas del ciclo y los 19 estadios de la espermiogénesis en base a la formación acrosomal de acuerdo a lo descrito por Hess en el ciclo del epitelio seminífero de rata 1990. Y al diagrama ilustrado de Dym y Clermont en el ciclo del epitelio seminífero rata que comprende de XIV etapas y 19 estadios de la espermiogénesis.

Para la identificación de las espermatogonias tipo A indiferenciadas (A und), A1, A2, A3, A4, A intermedia (A In) y espermatogonias tipo B en base a lo descrito por Chiarini y Meistrich en 2008.

Se identificaron las XIV etapas (Hess, 1990) del ciclo del epitelio seminífero, así como los 19 estadios o pasos de la espermiogénesis la cual está dividida en 4 fases (Golgi, Cap, Acrosoma y Maduración). A continuación se describe el ciclo del epitelio seminífero mencionando sus características más importantes de cada etapa.

Etapa I. Se caracteriza por la presencia de espermatogonias tipo (A), intermedias (In), tipo (B); espermatocitos primarios en paquitenio (P), espermátides en estadio 1 (ES1) redondas donde se observa el aparato de Golgi (G) desprovisto de gránulos y espermátides elongadas en estadio 15 de diferenciación (ES15) y células de Sertoli (S), figura 48.

Etapa II. Se encuentran espermatogonias intermedias (In) que dan paso a espermatogonias tipo (B), espermatocitos en paquitenio (P), espermátides redondas donde aparece la vesícula proacrosomal (V) que se caracteriza por pequeños gránulos proacrosómicos en estadio 2 (ES2) que empiezan a moverse al lumen y espermátides alargadas en estadio 16 de diferenciación (ES16), figura 48.

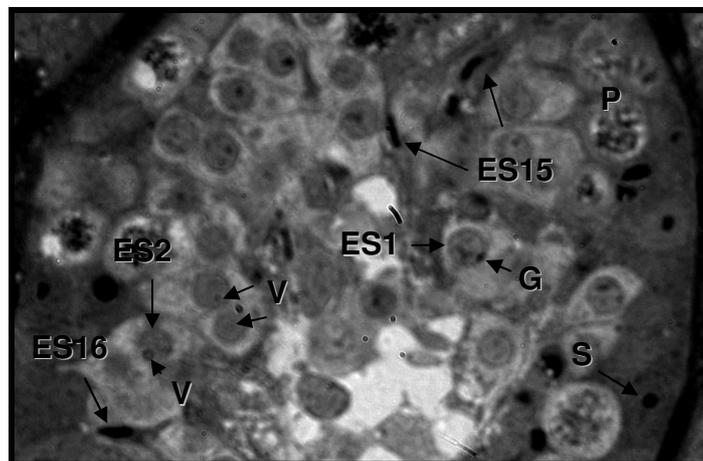


Figura 48. Espermatocitos primarios en paquitenio (P), espermátides en estadio 1 (ES1) se observa el aparato de Golgi (G), espermátides estadio 2 (ES2) aparece la vesícula proacrosomal (V), espermátides estadio 15 de diferenciación (ES15), espermátides alargadas en estadio 16 de diferenciación (ES16) y células de Sertoli (S), a 40 x.

Etapa III. Se observa un gránulo acrosomal (**Ga**) largo rodeado por una vesícula acrosomal (**V**) clara en la espermatídes estadio 3 (**ES3**), figura 49. Espermatogonias Intermedias, espermatocitos en paquiteno (**P**) y espermatídes en estadio 17 de diferenciación (**ES17**).

Etapa IV. Se observan espermatogonias A y B, espermatocitos en paquiteno (**P**). La vesícula acrosomal se pega a la membrana nuclear de la espermatíde estadio 4 de diferenciación (**ES4**). El aparato de Golgi (**G**) forma un arco intensamente teñido, figura 49.

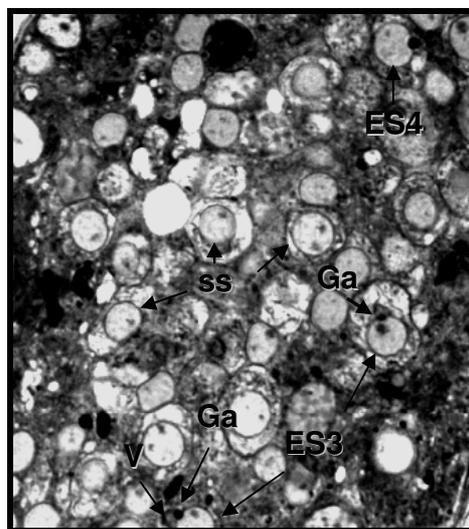


Figura 49. Espermatídes en estadio 3 (**ES3**) se muestra en gránulo acrosómico y vesícula acrosomal. Espermatíde en estadio 4 (**ES4**), se observa la vesícula más teñida y espermatocitos secundarios (**SS**), a 40x.

Etapa V. En las espermatídes estadio 5 el gránulo acrosomal se aplana y en el sistema acrosomal se forman unas delgadas líneas laterales que forman un arco sobre el núcleo (flechas **ES5**), figura 50. Se observan espermatogonias A y B, espermatocitos en paquiteno. Las espermatídes en estadio 17 están fuertemente embebidas en el citoplasma de las células de Sertoli.

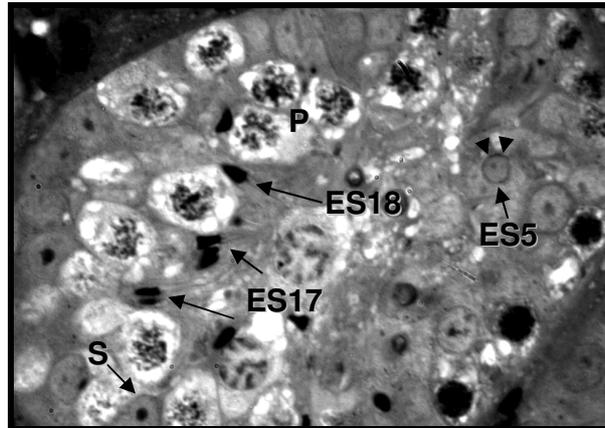


Figura 50. Espermatídes en estadio 5 (ES5) flechas donde se observa la formación del arco sobre el núcleo. Espermatídes alargadas (ES17) y (ES18), a 100 x.

Etapa VI. Se observan espermatogonias A y B, espermatocitos en paquitenio. Las espermatídes en estadio 18 (ES18), empiezan a moverse hacia el lumen, figura 49. En esta etapa la extensión lateral del sistema acrosomal cubre un cuarto a un cuarto del núcleo de la espermatíde en estadio 6 (ES6), figura 51.

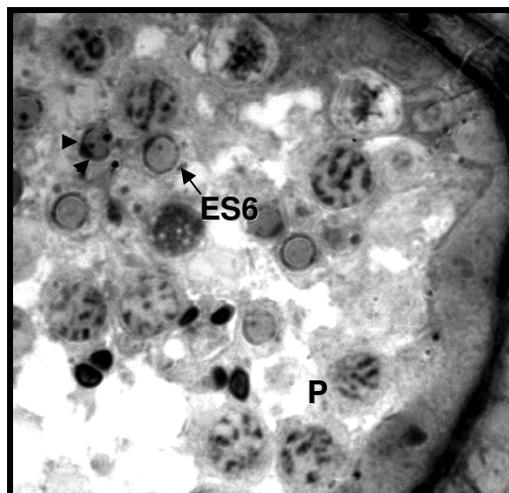


Figura 51. Espermatíde en estadio 6 (ES6), la extensión lateral del sistema acrosomal cubre un cuarto del núcleo de la Espermatocitos en paquitenio (P), a 100 x.

Etapa VII. La extensión acrosómica se extiende de un tercio a la mitad del núcleo de las espermatídes en estadio 7 (ES7), figura 52. Las espermatídes estadio 19 se encuentran distribuidos a lo largo de borde luminal con un granulo basófilo cerca del núcleo. Se observan espermatogonias A, espermatocitos en preleptoteno, paquitenio (P).

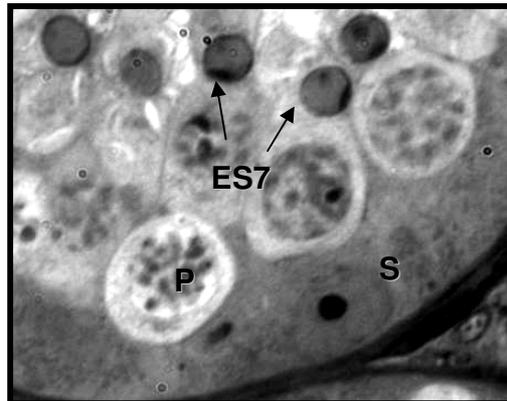


Figura 52. Espermatide en estadio 7 (ES7), la extensión acrosómica se extiende un tercio del núcleo. Células de Sertoli (S) y espermatocitos en paquiteno (P), a 100 x.

Etapa VIII. El sistema acrosómico de las espermatides en estadio 8 (ES8) están dirigidos la parte membrana basal, figura 53. Se observan cuerpos residuales vacuolados localizados a lo largo del lumen de espermatides en estadio 19. Se observan espermatogonias A, espermatocitos en preleptoteno (PL), paquiteno (P) y espermatides en estadio 19 de diferenciación espermatozoides (ES19).

Etapa IX. Se observan espermatogonias A, espermatocitos en leptoteno (L), paquiteno (P). El núcleo de las espermatides en estadio 9 están ligeramente alargadas (ES9), figura 53.

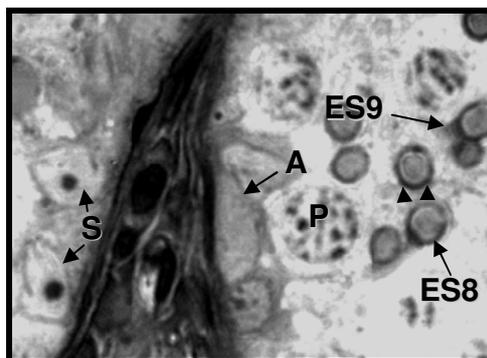


Figura 53. Espermatide en estadio 8 (ES8), dirigiéndose hacia la membrana basal. Espermatides en estadio 9 (ES9), se empiezan a alargar. Espermatocitos en paquiteno (P), a 100 x.

Etapa X. El núcleo de las espermatides en estadio 10 es oblongo y el sistema acrosomal forma el límite de la curvatura ventral se extiende a lo largo de un lado del núcleo (ES10), figura 54.

Etapa XI. Se observan espermatogonias A, espermatocitos en leptoteno (L), paquiteno (P). La espermátide tiene una protuberancia donde se encuentra el sistema acrosómico y el núcleo de las espermátides en estadio 11 sobresale en ángulo de la región caudal (ES11), figura 54.

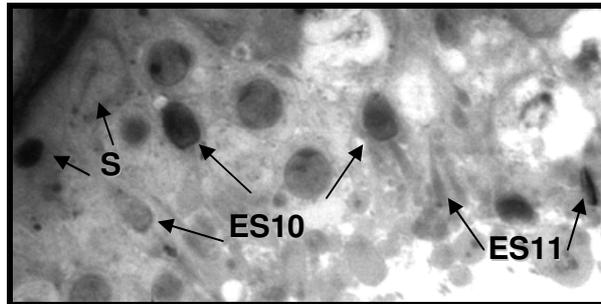


Figura 54. Espermátides en estadio 10 (ES10), tiene un núcleo oblongo. Espermátide estadio 11 (ES11), se empieza a alargar. Células de Sertoli (S), a 100 x.

Etapa XII. Se observan cabezas largas y estrechas en espermátides estadio 12 están condensadas con puntas romas (ES12), figura 55. Espermatogonias A, espermatocitos en zigoteno (Z), paquiteno (P).

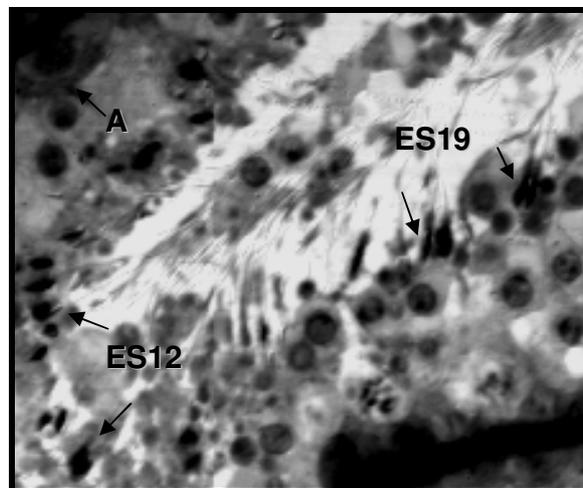


Figura 55. Espermátide en estadio 12(ES12), cabezas alargadas, estrechas y condensadas con puntas romas, Espermátides estadio 19 (ES19), dirigiéndose al lumen. Espermatogonias (A), a 100x.

Etapa XIII. El núcleo de las espermátides estadio 13 (ES13) tienen forma de bala ó espátula y están en paquetes separados por espermatocitos en paquiteno (P), zigoteno (Z), diploteno (D), figura 56.

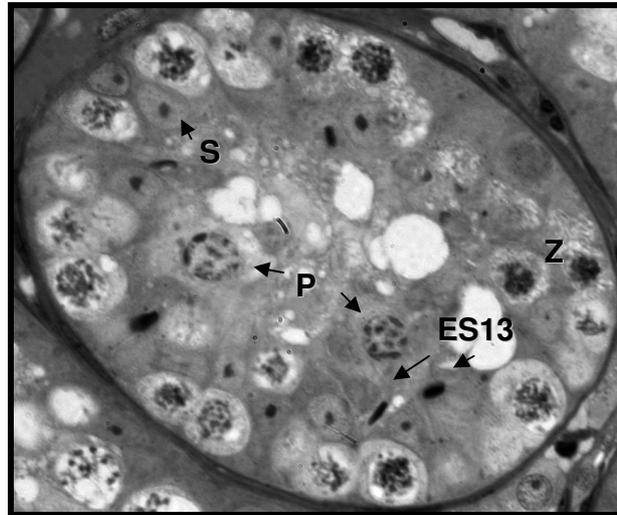


Figura 56. Espermatídes estadio 13 (ES13), el núcleo de las tienen forma de bala ó espátula. Espermatocitos en paquiteno (P), zigoteno (Z) y células de Sertoli (S), a 100 x.

Etapa XIV. Espermatocitos secundarios. Espermatocitos primarios en paquiteno (P), zigoteno (Z), Diploteno (D), y figuras meióticas, (figura 57).

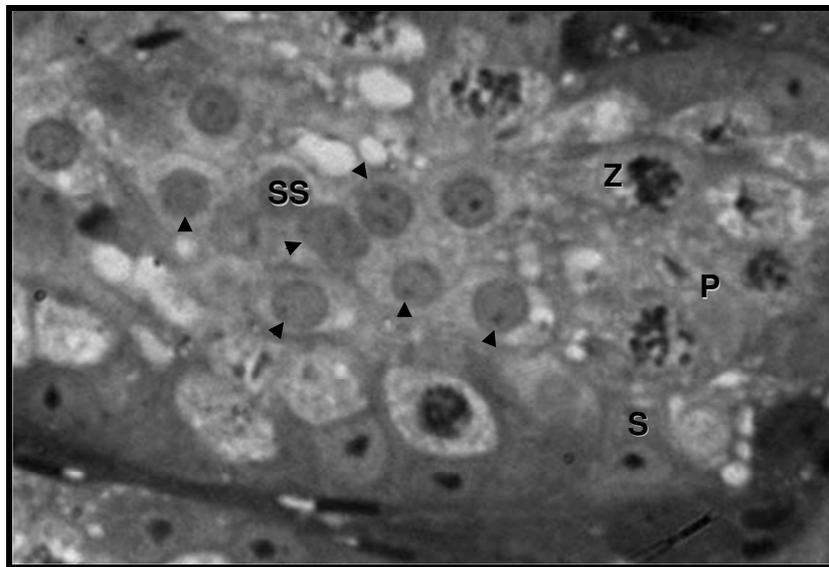


Figura 57. Espermatocitos secundarios (SS). Espermatocitos primarios en paquiteno (P), zigoteno (Z) y células de Sertoli (S), a 40 x.

5) INMUNOHISTOQUIMICA de *Artibeus jamaicensis*.

Se utilizó el método de inmunohistoquímica para detectar la expresión de los diferentes marcadores descritos para mamíferos como el ratón. Para la detección de las células de la línea germinal se utilizó el marcador contra la proteína del gen *Vasa*. Para la identificación de las células pluripotenciales y de la línea germinal se empleó el factor de transcripción Oct-4. Así como C-kit un factor de células madre (SCF). También se analizó la actividad mitótica usando el marcador (H3) y para la actividad meiótica (SCP1). Por otra parte se utilizó Wt-1 que es un factor de transcripción en la determinación y diferenciación sexual. Y MIS como un factor de crecimiento y diferenciación sexual.

Las células resultaron positivas a los marcadores de la línea germinal (*Vasa*), así como Oct-4 factor de pluripotencialidad en espermatogonias A1-A4, tipo B. La expresión de C-kit es detectada en la superficie celular de espermatogonias tipo A1-A4, espermatogonia tipo B, espermatocitos en preleptoteno y paquiteno.

Para la proliferación celular se observó la actividad de H3 en espermatogonias que se encuentran en el área basal de los túbulos seminíferos, para la actividad meiótica Scp1 en espermatocitos primarios. La expresión de Wt-1 (tumor de Wilm), se observó en los túbulos seminíferos (espermatogonias espermatocitos primarios, secundarios, espermátides y espermatozoides). Así como en las células de Sertoli e intersticiales (células de Leydig). La expresión de la hormona antimülleriana MIS, se detectó en las células Sertoli de testículos diferenciados, y en el área del túbulo seminífero.

g) Detección de los marcadores H3, C-KIT, OCT-4 y SCP1 en tejido testicular del murciélago *Artibeus jamaicensis*.

La expresión de los marcadores de forma sencilla: C-kit es detectado en el núcleo de espermatogonias tipo A1 - A4, espermatogonias tipo B, espermatocitos en preleptoteno y paquiteno (figura 58 A). Oct-4 se expresa en las células de la línea germinal que se encuentran en el área basal del túbulo (figura 58 B). H3 se detecta en la periferia del túbulo seminífero en espermatogonias A1 – A4, donde se lleva a cabo la auto renovación de la línea germinal por mitosis (figura 58 C). La expresión de SCP1 en los complejos sinaptonémicos de células meióticas; espermatocitos primarios que inician la profase I de la meiosis I así como espermatocitos en meiosis II (figura 58 D).

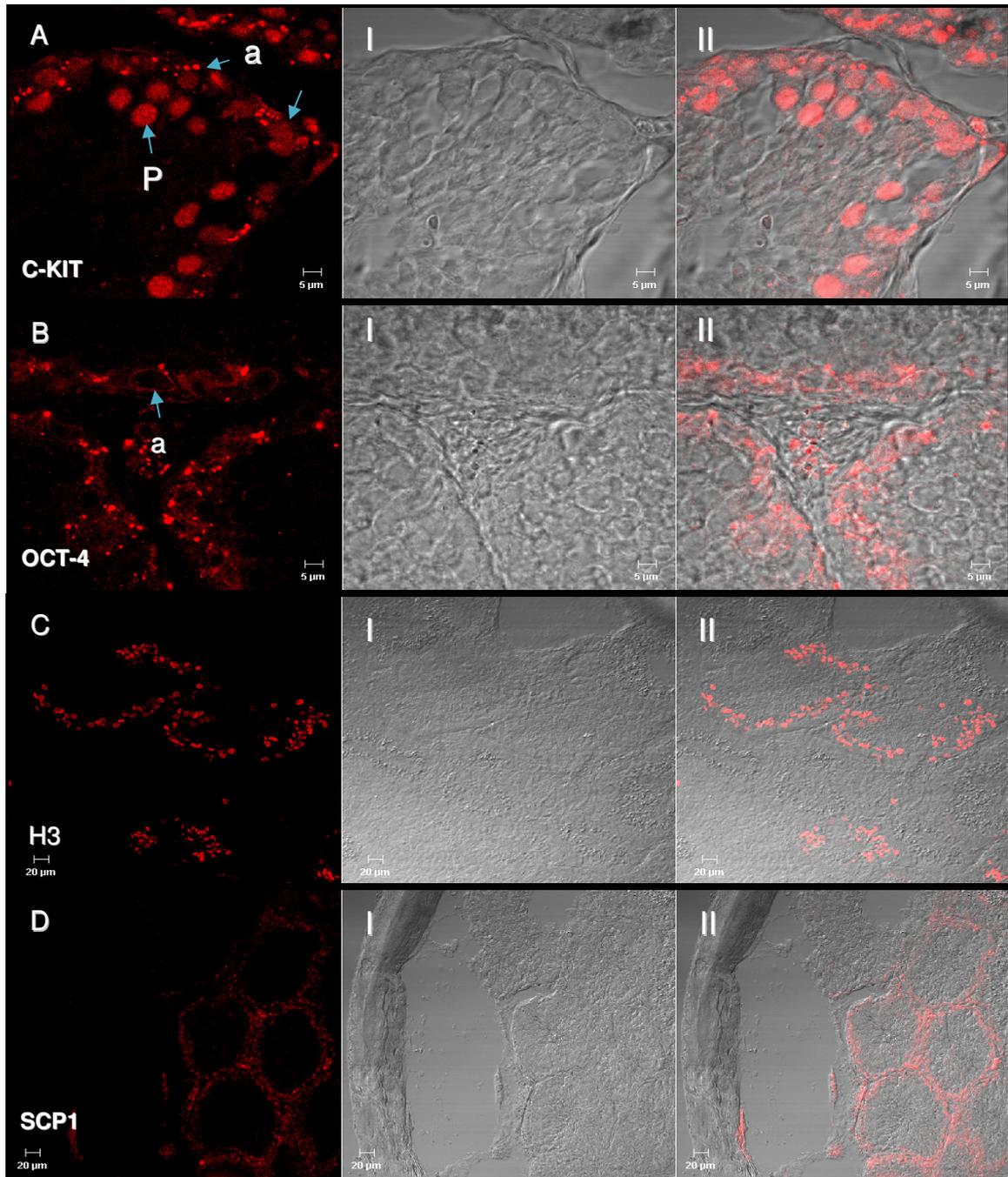


Figura 58. Inmunofluorescencia sencilla: A) expresión de la proteína C-KIT a 100x en el núcleo de espermatogonias (a), espermatocitos primarios en paquiteno (P); B) detección de OCT-4 a 100x, se observa en espermatogonias (a); C) H3 expresión de proliferación celular en espermatogonias A1 – A4; D) SCP1 en células meióticas (espermatocitos primarios y secundarios). I) Microfotografía campo claro corte normal. II) Microfotografía en contraste Nomarski (DIC).

La detección simultánea de los marcadores H3/C-KIT/OCT-4, por inmunohistoquímica triple. Se observó la expresión de H3 en la periferia del túbulo seminífero en espermatogonias A1 – A4, (figura 59 A). La expresión de C-KIT es detectada en el núcleo de espermatogonias tipo A1 - A4, espermatogonia tipo B, espermatocitos en preleptoteno y paquiteno **P** (figura 59 B). OCT-4 se expresa en las células de la línea germinal (espermatogonias y espermatocitos en paquiteno) que se encuentran en el área basal del túbulo (figura 59 C).

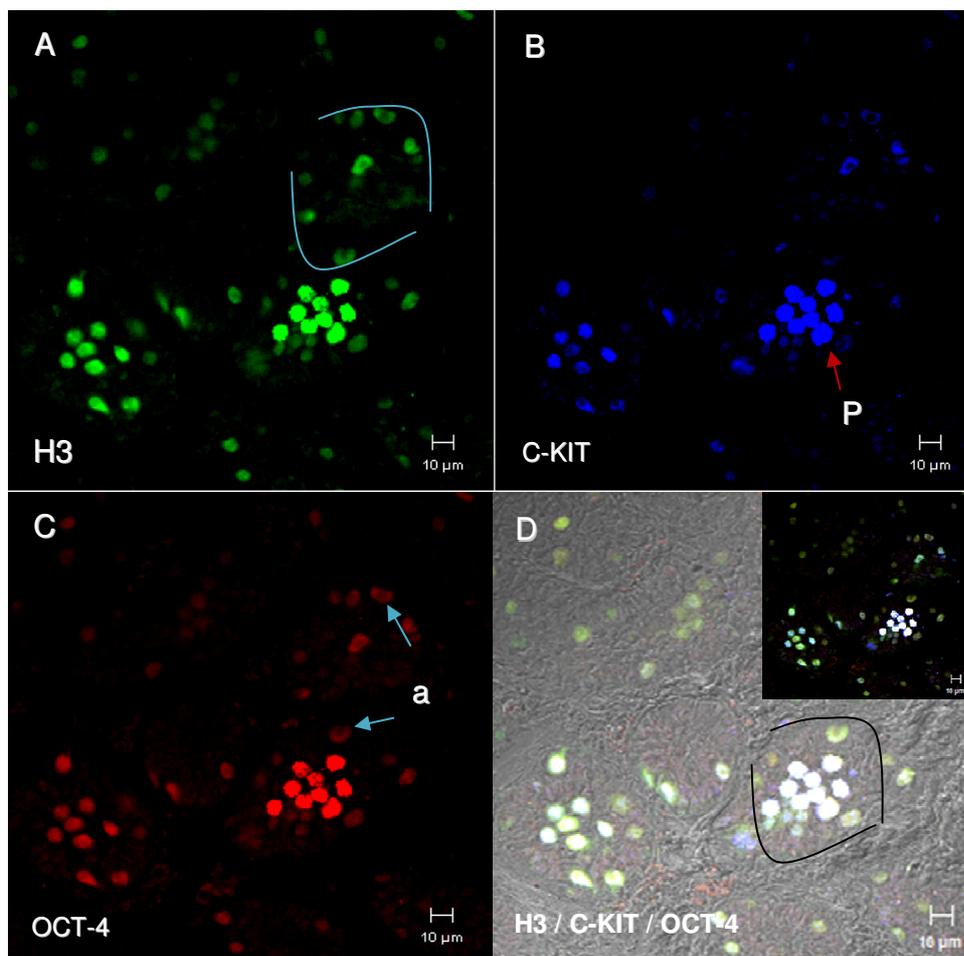


Figura 59. Inmunofluorescencia triple: A) expresión de H3, en espermatogonias en mitosis; B) C-KIT, se observa en espermatogonias y espermatocitos en paquiteno (flecha **P**); C) detección de OCT-4 en espermatogonias (flechas **a**); D) se observa la colocalización de los 3 marcadores de forma simultánea, a 40 x.

Detección combinada de los marcadores H3/OCT-4/VASA. Se observa la expresión de H3 en espermatogonias A1 – A4, (figura 60 A). OCT-4 se expresa en las células de la línea germinal (espermatocitos primarios) que se encuentran en el área basal del túbulo (figura 60 B). VASA se expresa en células de la línea germinal espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios (figura 60 C).

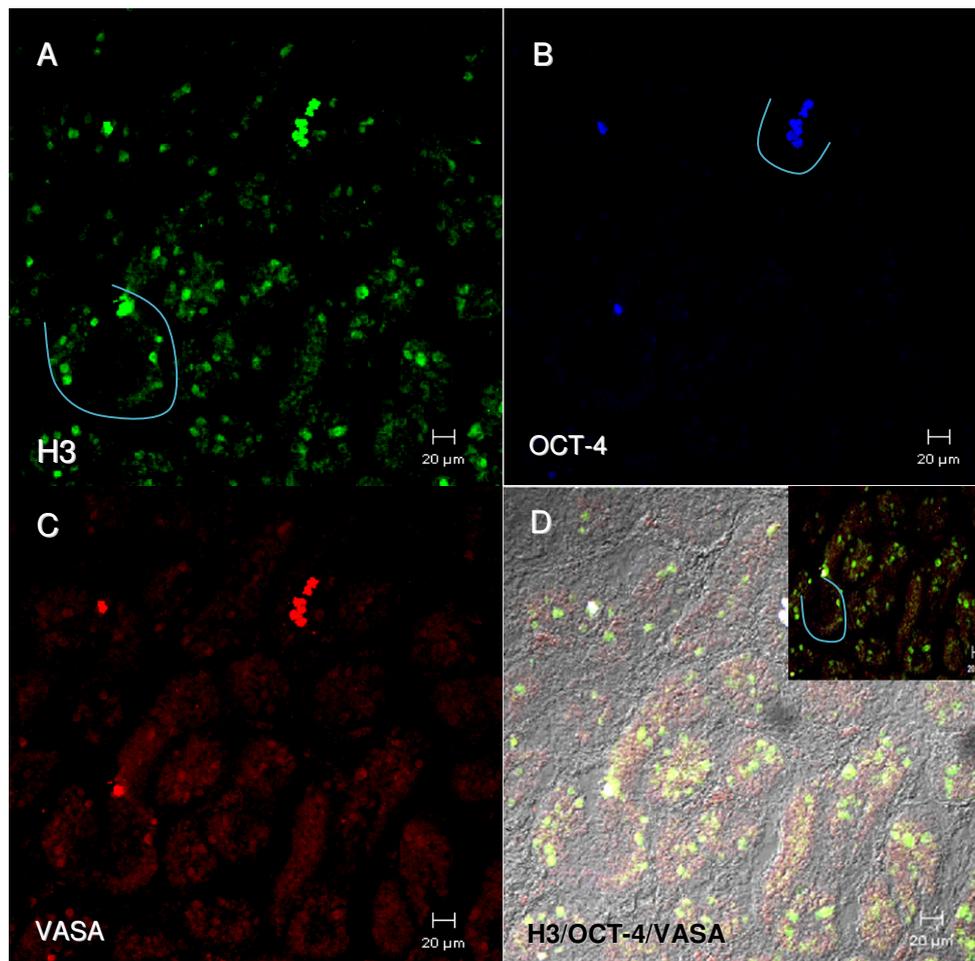


Figura 60. Inmunofluorescencia triple: A) expresión de H3, en espermatogonias A1-A4; B) OCT-4, se observa en espermatogonias; C) detección de VASA en espermatogonias y espermatocitos; D) expresión simultánea de los 3 marcadores en células de la estirpe germinal, a 40x.

h) Análisis de la actividad proliferativa H3 y meiótica SCP1.

La detección simultánea de los marcadores H3/SCP-1/VASA. Para determinar la actividad mitótica (H3) y meiótica (SCP1). La expresión de H3 se observó de espermatogonias A1 – A4, (figura 61 A). La expresión de SCP1 en los complejos sinaptonémicos de células meióticas; espermatocitos primarios que inician la profase I de la meiosis I así como espermatocitos en meiosis II (figura 61 B). VASA se expresa en células de la línea germinal espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios (figura 61 C).

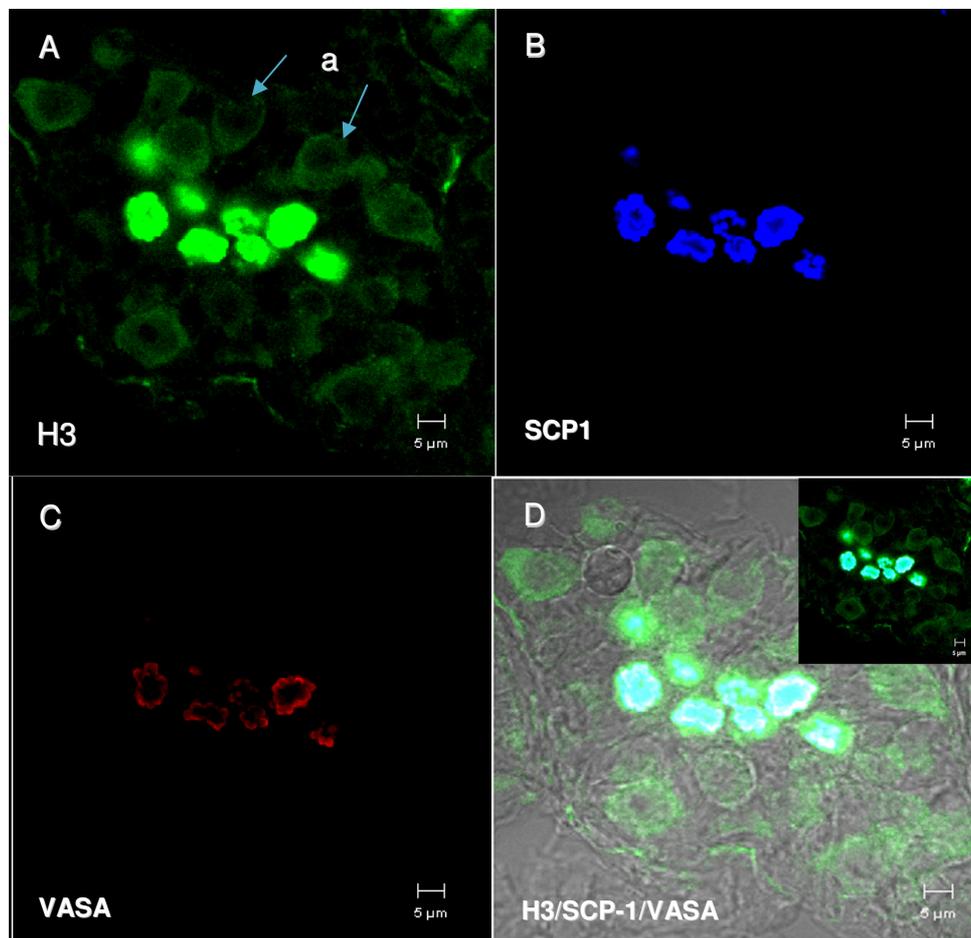


Figura 61. Inmunofluorescencia triple: A) Expresión de H3, se observa en espermatogonias; B) SCP1, se observa en el área adluminal en células meióticas (espermatocitos primarios y secundarios); c) detección de VASA en espermatocitos; D) se observan los 3 marcadores de forma simultánea en células de la estirpe germinal, a 100 x.

i) Factor de transcripción temprana Wt-1 y sustancia inhibidora Mülleriana.

Detección simultánea de los marcadores WT-1/MIS/VASA. Para observar su expresión en machos adultos. La expresión de Wt-1, se observó en los túbulos seminíferos tanto en la membrana basal como en las células del tracto genital. Así como en las células de Sertoli y células de Leydig (figura 62 A). La expresión de la hormona antimülleriana MIS en los testículos diferenciados, presente en toda el área del túbulo seminífero (figura 62 B). Vasa se expresa en células de la línea germinal espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios (figura 62 C).

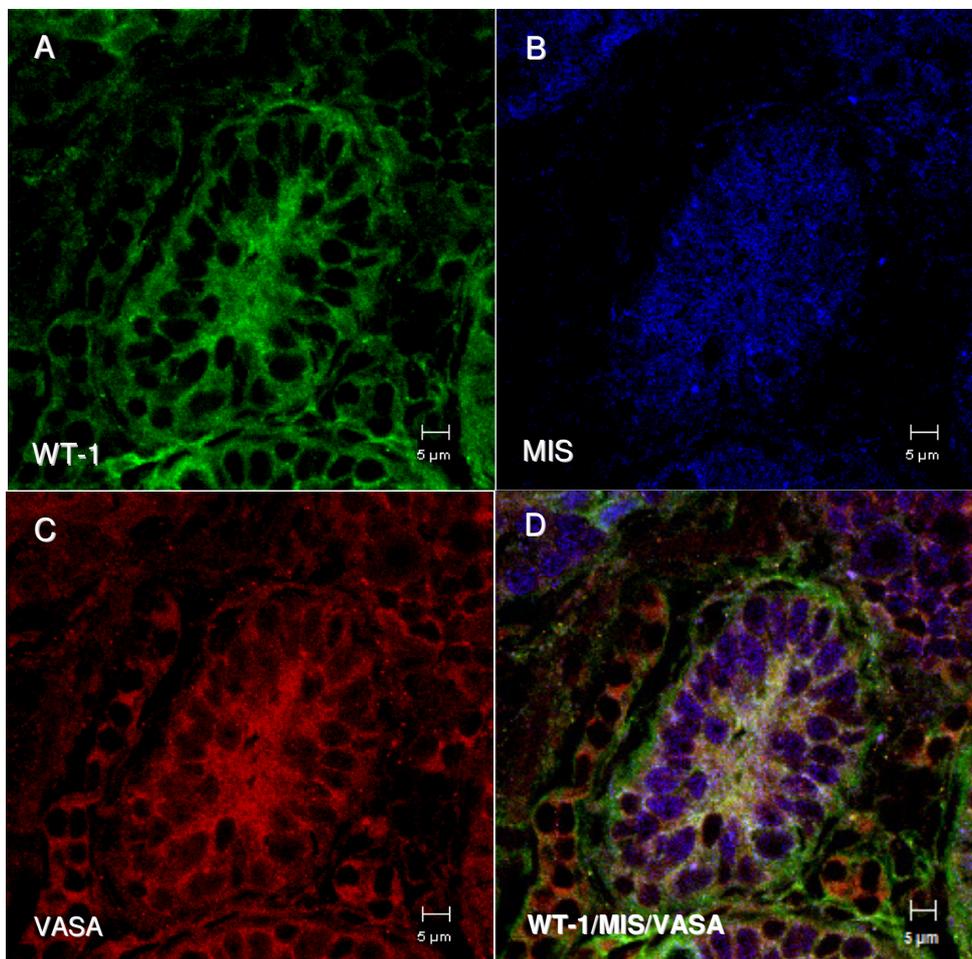


Figura 62. Inmunofluorescencia triple: A) expresión de WT-1, se observa el marcador de diferenciación y determinación sexual en el área del túbulo seminífero y en las células intersticiales; B) MIS, se observa la presencia de la sustancia antimülleriana en testis diferenciados toda el área del túbulo seminífero; C) detección de VASA en células de la línea germinal; D) se observan los 3 marcadores en toda el área del túbulo y el área intersticial, a 20x.

6) INMUNOHISTOQUIMICA *Sturnira lilium*.

Se utilizó el método de inmunohistoquímica para detectar la expresión de los diferentes marcadores descritos para mamíferos como el ratón. Para la detección de las células madre, se utilizó Oct-4 para detectar la expresión del un factor de transcripción relacionado con la totipotencialidad de células stem embrionarias y células germinales. Para la detección de las células progenitoras de la línea germinal se utilizó Vasa, C-kit como factor de células madre (SCF). Se utilizaron marcadores para detectar la actividad mitótica H3 y para la actividad meiótica SCP-1. Y Wt-1 que es un factor de transcripción en la determinación y diferenciación sexual. MIS como un factor de crecimiento y diferenciación sexual.

j) Detección de los marcadores OCT-4, H3, C-KIT, VASA en tejido testicular del murciélago *Sturnira lilium*.

OCT-4 se expresa en las células de la línea germinal (espermatogonias (a) y espermatocitos en paquiteno), que se encuentran en el área basal del túbulo (figura 63 A).

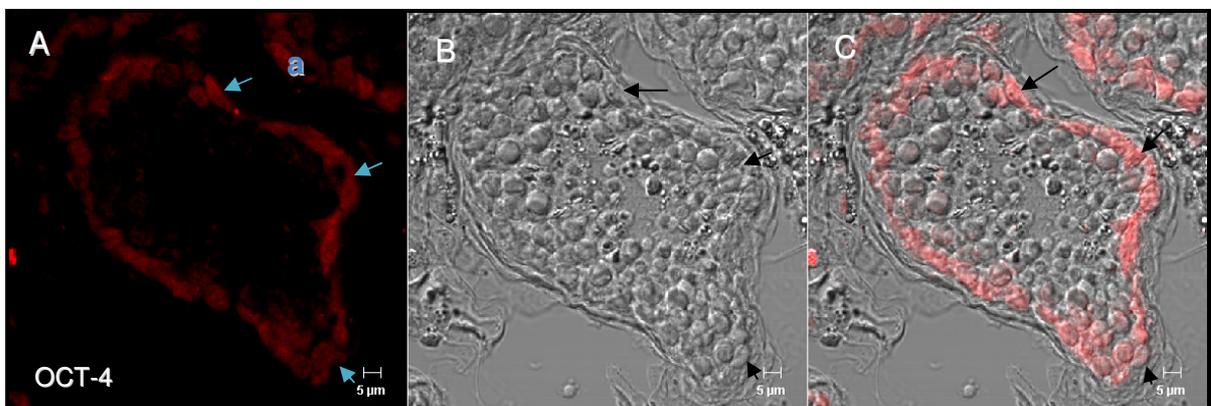


Figura 63. Inmunofluorescencia sencilla: A) expresión de la proteína del gen *Oct-4*, se observa espermatogonias (flechas a) precursoras de espermatocitos en la periferia del testículo. B) Microfotografía corte normal. C) Microfotografía en contraste Nomarski (DIC), a 40 x.

Detección triple de los marcadores H3/C-KIT/VASA. La expresión de H3 se observa en la periferia del túbulo en espermatogonias A1 – A4, (figura 64 A). La expresión de C-KIT es detectada en el citoplasma de espermatogonias tipo A1 - A4, espermatogonia tipo B (figura 64 B). VASA se expresa en células de la línea germinal (espermatogonias, figura 64 C).

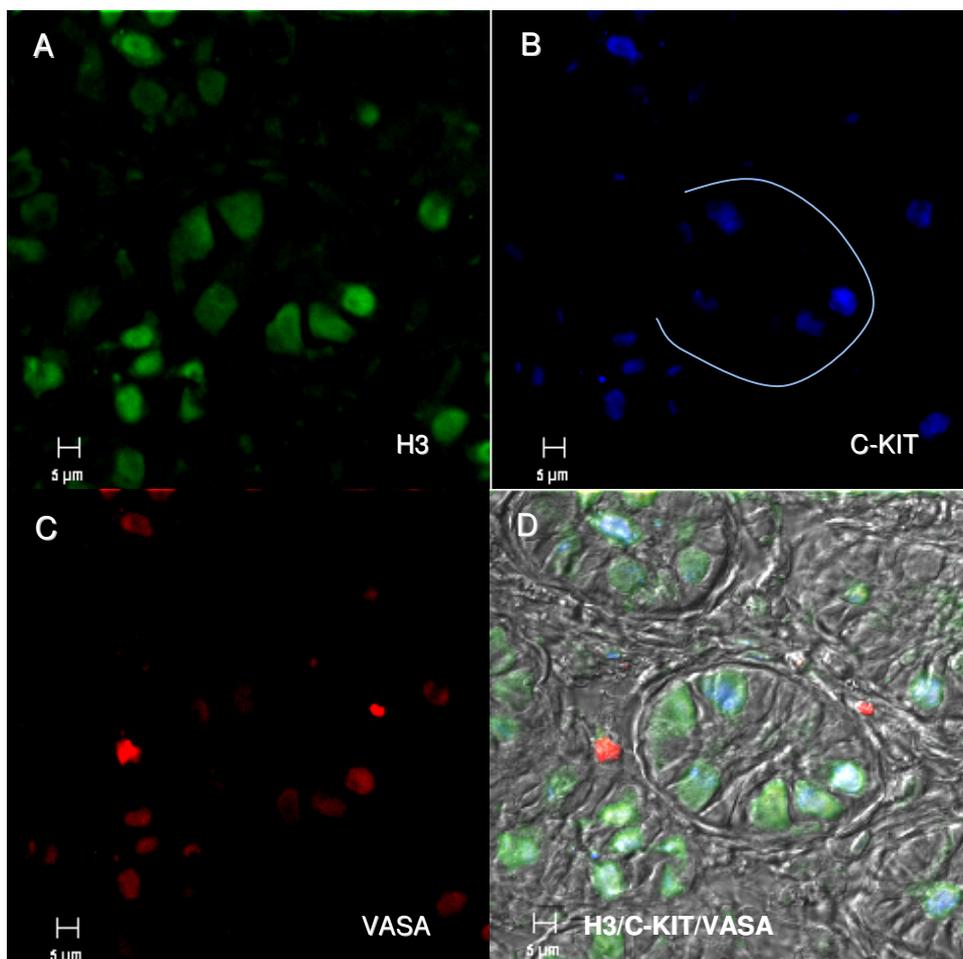


Figura 64. Inmunofluorescencia triple: A) expresión de H3, se observa el marcador de proliferación celular en el área basal del túbulo seminífero en espermatogonias A1-A4; B) C-KIT, se observa en el área basal en espermatogonias, precursoras de espermatocitos; C) VASA detección de la línea germinal (espermatogonias); D) se observa la colocalización de los 3 marcadores al interior de los túbulos, a 40x.

Detección simultánea de los marcadores H3/OCT-4/VASA. La expresión de H3 se observa en la proliferación celular de espermatogonias A1 – A4, (figura 65 A). OCT-4 se expresa en las células de la línea germinal (espermatogonias) que se encuentran en el área basal del túbulo (figura 65 B). VASA se expresa en células de la línea germinal (espermatogonias, figura 65 C).

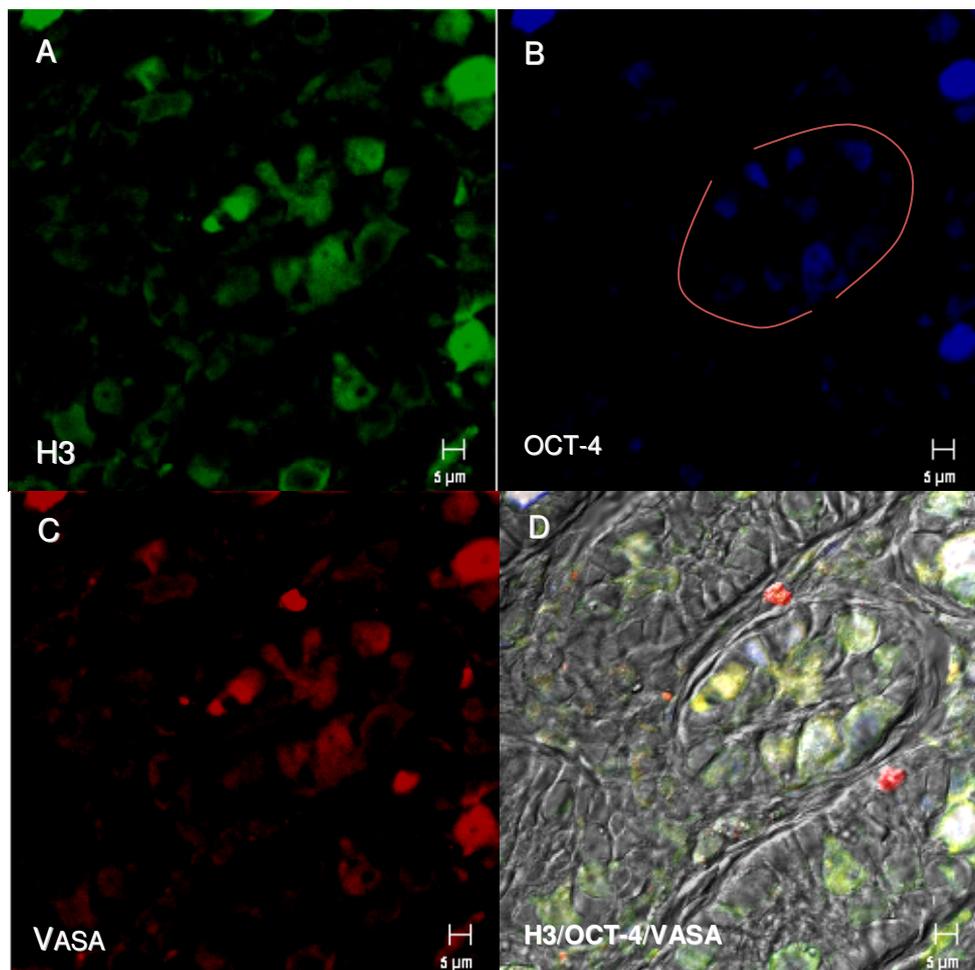


Figura 65. Inmunofluorescencia triple: A) expresión de H3 en espermatogonias A1-A4; B) OCT-4, se observa en espermatogonias; C) detección de VASA en células de la línea germinal; D) se observan los 3 marcadores en células de la estirpe germinal, a 40 x.

K) Análisis de la actividad proliferativa (H3) y meiótica (SCP1).

Detección simultánea de los marcadores H3/SCP1. Se aprecia la expresión de H3, en la periferia del cordón seminífero donde se lleva a cabo la auto renovación de la línea germinal por mitosis (espermatogonias A1 – A4, figura 66 A). La expresión de SCP1 en los complejos sinaptonémicos de células meióticas; espermatocitos primarios que inician la profase I de la meiosis I así como espermatocitos en meiosis II (figura 66 B).

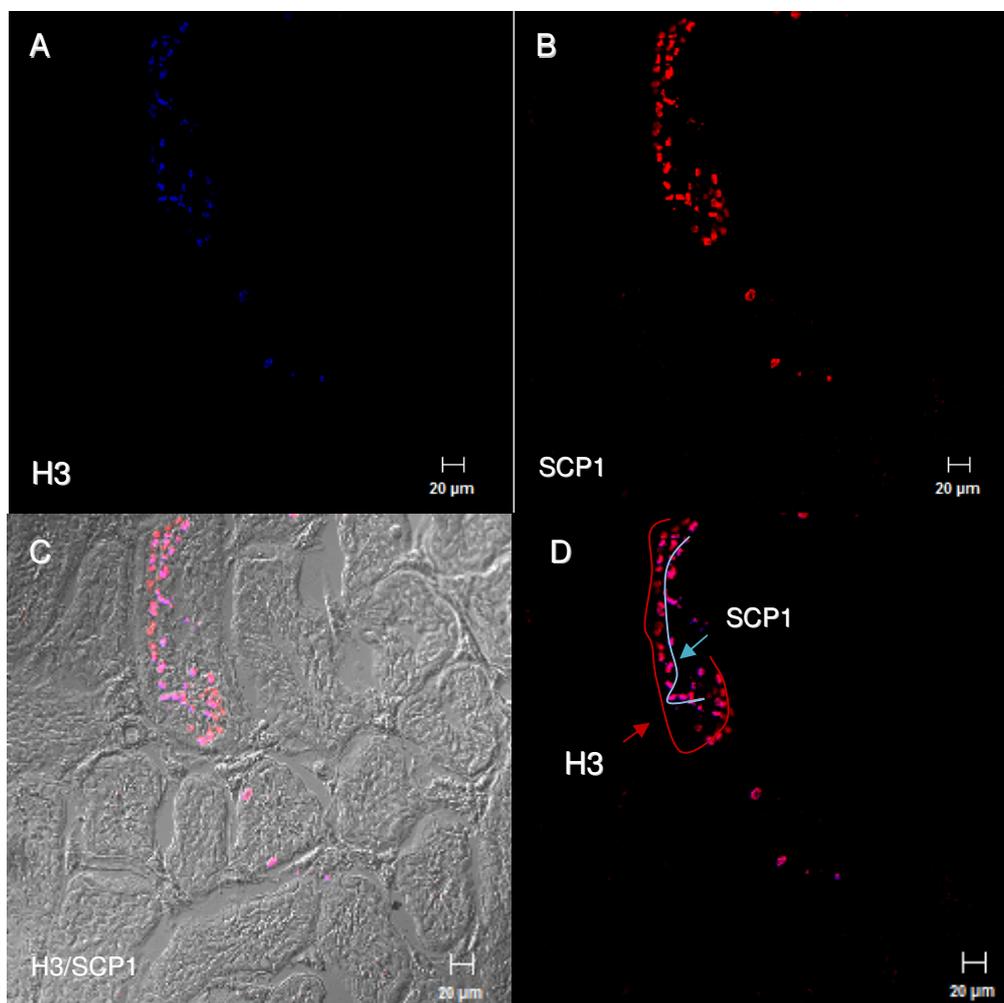


Figura 66. Inmunofluorescencia doble: A) expresión de H3, se observa el marcador de proliferación celular en el área basal del túbulo seminífero en espermatogonias mitóticas; B) SCP1 se observa en el área adluminal, en células meióticas (espermatocitos primarios y secundarios). C) y D) se observa la colocalización de los 2 marcadores, a 20x.

I) Factor de transcripción temprana WT-11 y sustancia inhibidora Mülleriana.

Detección simultánea de los marcadores WT-1/MIS/VASA. La expresión de WT-1, se detectó en los túbulos (células del tracto genital). Así como en las células de Sertoli y células de Leydig, (figura 67 A). La expresión de la hormona antimülleriana MIS en los testículos diferenciados, presente en toda el área del túbulo seminífero, (figura 67 B). VASA se expresa en células de la línea germinal (67 C). VASA se expresa en células de la línea germinal (67 C).

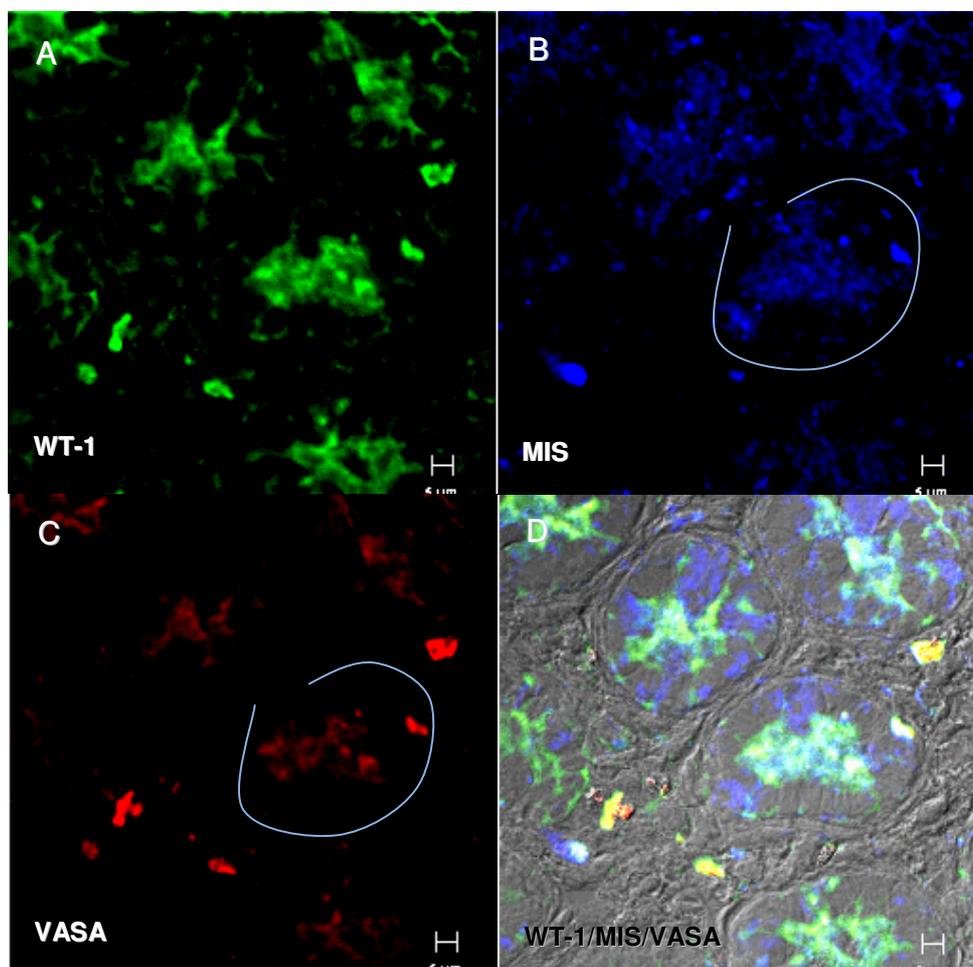


Figura 67. Inmunofluorescencia triple: A) expresión de WT-1, se observa el marcador de diferenciación y determinación sexual en el área del túbulo seminífero y en las células intersticiales; B) MIS, se observa la presencia de la sustancia antimülleriana en testis diferenciados toda el área del túbulo seminífero; C) detección de VASA en células de la línea germinal; D) se expresan los 3 marcadores en toda el área del túbulo, a 40 x.

m) Tinción Coomassie

Perfil de proteínas en gel de poliacrilamida al 15 %, teñido con azul Coomassie para determinar la expresión de las proteínas H3 (17 kDa) y Wt-1 (53 kDa) con sobrenadante (S) y precipitado (P) de ambas especies, figura 68.

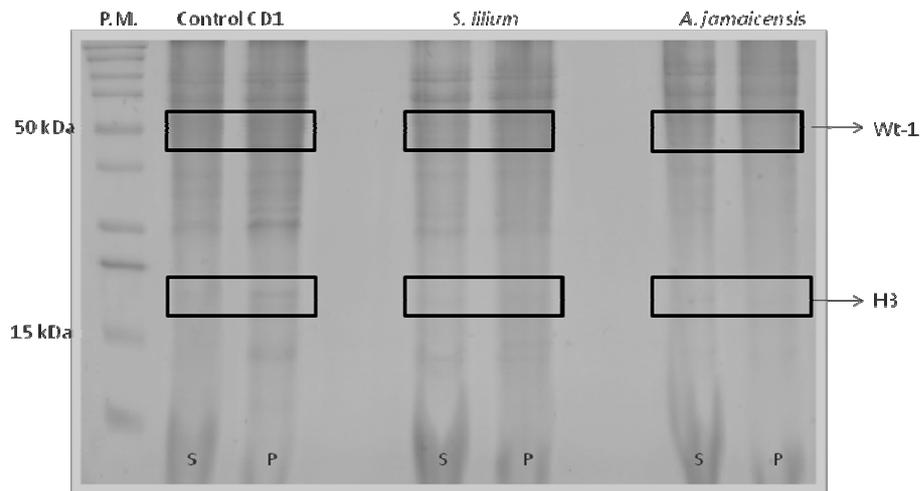


Figura 68. Perfil de proteínas al 15% teñido con azul Coomassie para ambas especies de murciélagos.

Perfil de proteínas en gel de poliacrilamida al 7.5 % teñido con azul Coomassie para determinar la expresión de las proteínas C-KIT (145 kDa), VASA (76 kDa) y OCT-4 (50 kDa) con sobrenadante (S) y precipitado (P) de ambas especies, figura 69.

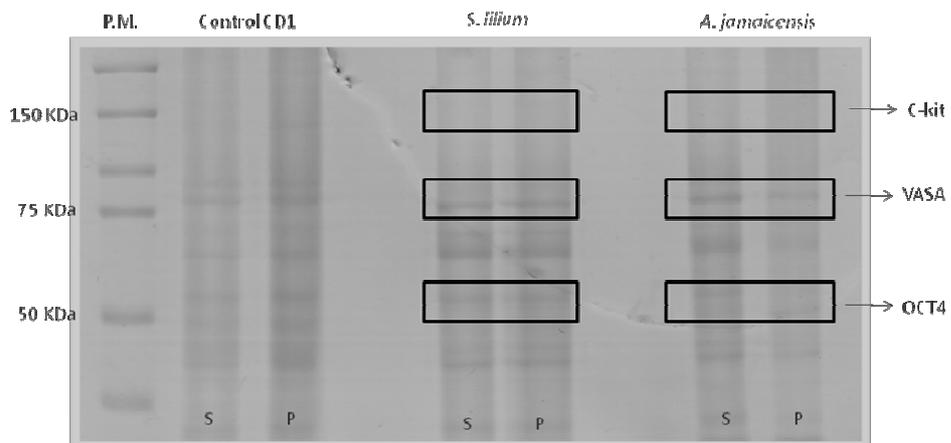


Figura 69. Perfil de proteínas al 7.5% teñido con azul Coomassie para ambas especies de murciélagos.

7) Análisis de la especificidad y reactividad de los marcadores (C-kit, Oct-4, Vasa, Mis y Wt-1) por “Western blot”.

La especificidad y reactividad de los anticuerpos H3 (17 kDa) y Wt-1 (53 kDa) fue confirmada. Se encontraron los pesos esperados de ambas proteínas, tanto para *Artibeus jamaicensis* como para *Sturnira lilium*. La proteína WT-1 de 53 kDa, se encuentra tanto en el sobrenadante como en el precipitado de ambas especies. En cambio para H3 (17 kDa), solo se encuentra de manera marca en los precipitados, no así en los sobrenadantes, figura 70.

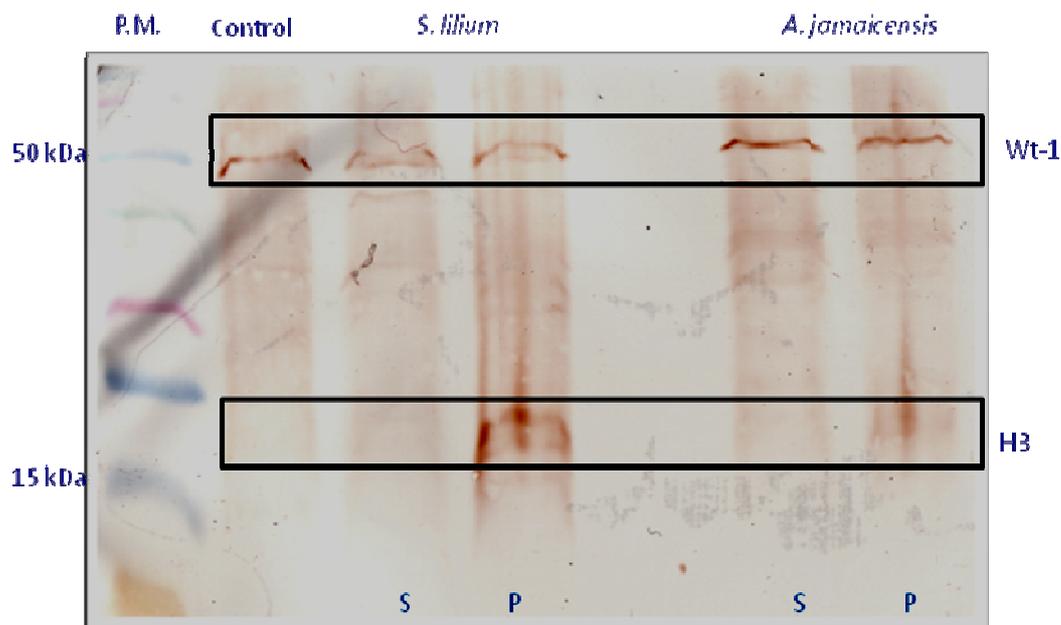


Figura 70. Membrana PVDF al 15 %, proteínas H3 (17 kDa) y WT-1 (53 kDa) con sobrenadante (S) y precipitado (P) de las dos especies de murciélagos *Sturnira lilium* y *Artibeus jamaicensis*.

La especificidad y reactividad de los anticuerpos, C-kit (145 kDa), Vasa (76 kDa) y Oct-4 (50 kDa) en *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*, fue confirmada. Se encontraron los pesos esperados para la proteína de C-KIT (145 kDa) que se expresa de manera marcada en *Artibeus jamaicensis*, no así para *Sturnira lilium* siendo más tenue. Para la proteína de VASA (76 kDa) se encuentra en ambas especies tanto sobrenadante como en

el precipitado aunque de manera muy tenue. En cambio para OCT-4 (50 kDa) no se encontró el peso esperado, se encontró la banda muy marcada entre los 60 kDa la cual está presente en ambas especies, figura 71.

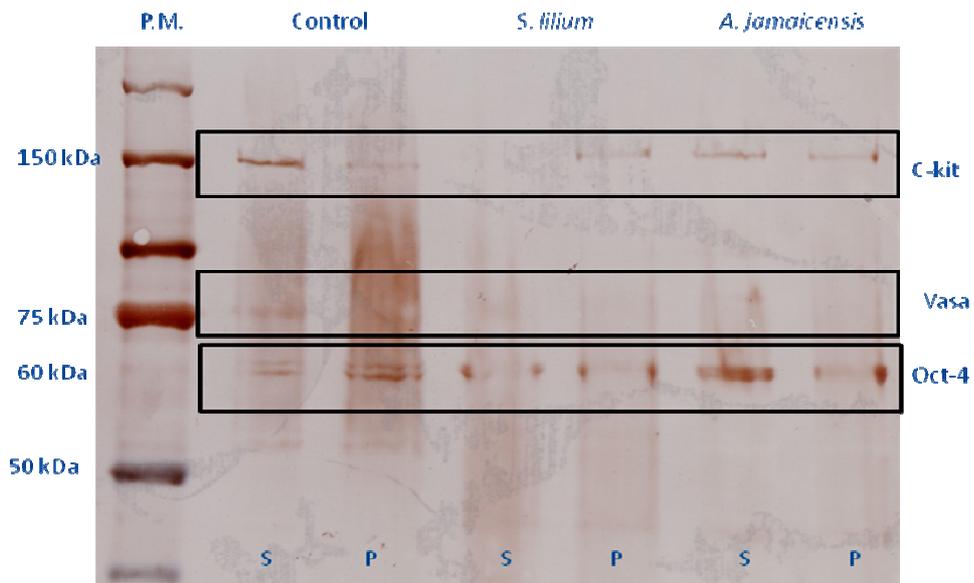


Figura 71. Membrana PVDF al 7.5 %, para los anticuerpos C-kit (145 kDa), Vasa (76 kDa) y Oct-4 (50 kDa) con sobrenadante (S) y precipitado (P) de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*.

IX) DISCUSIÓN

Las características morfológicas de los machos adultos de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*, nos permitió determinar su estado reproductivo activo. Se encontraron los testículos en la base del pene y concuerda con lo descrito para murciélagos de la especie *Artibeus lituratus* (Oliveira y col., 2009). En cuanto al peso promedio de *Artibeus jamaicensis* fue 36.15 gramos, estos datos concuerdan con los datos reportados para esta especie los cuales oscilan entre 29 y 51 gramos (Elizondo, 1999). Para *Sturnira lilium* el peso promedio fue de 18.95 gramos, semejante al intervalo 13 a 18 gramos reportado por Elizondo, 1999.

La longitud promedio de los testículos de los machos de *Artibeus jamaicensis* fue de 0.5 cm y se encuentra en el intervalo de 3.5 a 10.0 mm que fue reportado para esta especie por (Forman y Genoways 1979). Para *Sturnira lilium* la longitud promedio de los testículos fue de 0.58 cm. Que se asemejan a los datos reportados en un estudio realizado donde se obtuvo un intervalo entre 4 y 8 mm en machos adultos de *Sturnira lilium* y para machos subadultos se obtuvo una fluctuación entre 2.5 y 4 mm (Jones y Phillips 1976).

Respecto a la longitud del antebrazo se obtuvo un promedio de 5.3 centímetros. Un estudio realizado en Yucatán reportó para esta especie un promedio de 55.43 mm en la longitud del antebrazo (Ortega y Arita 2004). Para *Sturnira lilium* se obtuvo un valor promedio en la longitud del antebrazo de 3.8 cm. Los datos reportados para esta especie oscila entre 36.6 a 45 mm en la longitud del antebrazo (Hall, 1981). Sin embargo un estudio realizado indica que la longitud del antebrazo es independientes a su estado reproductivo (Oliveira y col., 2009).

Se obtuvo un promedio de 123 μm en el diámetro de los túbulos seminíferos de *Artibeus jamaicensis*, en cambio para *Sturnira lilium* el promedio fue de 94 μm . De acuerdo a lo descrito para especies estacionales como *C. mexicanus* se reporta un intervalo de 35.1 μm a 179.9 μm en el diámetro de los túbulos seminíferos (León, 2007). Para la especie tropical *Artibeus lituratus* se reporta una fluctuación anual de 80 μm a 150 μm (Oliveira y col., 2009), mientras que para esta misma especie se reportó un intervalo de 130 μm a 306.7 μm (Duarte y Talamoni 2009), especie con la cual comparte una estrecha relación filogenética al ser una subespecie del genero *Artibeus*, y los datos obtenidos para *Artibeus jamaicensis* se encuentra en el rango reportado, sin embargo para *Sturnira lilium*

comparte la subfamilia Stenodermatinae y los datos obtenidos están en el rango reportado.

En cuanto a la organización del epitelio seminífero de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium* se encontró un patrón típico descrito en otros mamíferos como el humano, ratón y rata. Se identificaron células de Sertoli en la membrana basal, del tubulo seminífero; espermatogonias en diferentes grados de desarrollo; espermatoцитos primarios y secundarios; espermátides redondas, alargadas y espermatozoides.

Se identificaron espermatogonias indiferenciadas As "single", Apr "pair" y Aal "aligned". Los subsecuentes tipos celulares descritos fueron A1, A2, A3 y A4, así como espermatogonias intermedias (AIn) y espermatogonias tipo B. Que darán paso al proceso de espermatogénesis con la formación de espermatoцитos primarios, secundarios, espermátides redondas, alargadas y finalmente a la formación de espermatozoides.

En el ratón se han descrito 7 tipos de espermatogonias A (Asingle, Apair, Aaligned, A1, A2, A3 y A4) [de Rooij, 1998]. De estas As "single" se considera una espermatogonia madre, ya que estas son las únicas se auto-renuevan (Clermont y Bustos, 1968). Las espermatogonias Apr y Aal, se dividen para formar colonias que no están sincronizadas con el ciclo del epitelio seminífero. En cambio las espermatogonias A1- A4 están sincronizadas con el ciclo del epitelio (de Rooij y Russell, 2000).

Aunque se encuentra un patrón claro en la organización del epitelio seminífero respecto al ratón y la rata, existen diferencias amplias en el sistema de células madre espermatogoniales de otros mamíferos. En cuanto al tipo, el número y el grado de eficiencia espermatogonial que hasta el momento no sea detectado en todos los mamíferos (Ehmcke, 2006).

El ciclo del epitelio seminífero de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium* comprende las XIV etapas, así como los 19 estadios de la espermiogénesis descritos en el ratón y la rata.

Se han descrito XI etapas y 13 estadios de la espermiogénesis en el ciclo del epitelio seminífero de Java fruit bat (*Pteropus vampyrus*) y X etapas y 13 estadios en Japanese lesser horseshoe bat (*Rhinolophus cornutus*) [Morigaki y col., 2001].

Por Inmunohistoquímica se detectó la expresión de las diferentes proteínas, usando marcadores policlonales descritos para otros mamíferos como el ratón. Se observó la presencia de las células progenitoras de la línea germinal (Vasa). Oct-4 como un factor de pluripotencialidad, C-kit como un factor de células madre. Se observó los marcadores de

la actividad mitótica H3 y la actividad meiótica SCP1. Y Wt-1 que es un factor de transcripción en la determinación y diferenciación sexual, y MIS como un factor de crecimiento y diferenciación sexual para *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*.

La expresión de C-KIT fue detectada en la superficie celular de espermatogonias tipo A1-A4, espermatogonia tipo B, espermatoцитos en preleptoteno. La expresión de C-KIT es detectada en la superficie celular de espermatogonias tipo A1-A4, espermatogonia tipo B, espermatoцитos en preleptoteno y células de Leydig (Yoshinaga y col., 1991). El receptor de C-KIT se expresa en células de Leydig, así como en la diferenciación y maduración de células de la línea germinal. (Sandlow y col., 1996). C-KIT regula la migración, proliferación y apoptosis de las células germinales primordiales durante el desarrollo de la gónada en etapa fetal. Así como la proliferación de las espermatogonias en etapa adulta. (Mauduit y col., 1999). La proliferación y/o supervivencia de las espermatogonias tipo A1-A4 son dependientes de C-KIT (Yoshinaga y col., 1991). Sorrentino y col., en 1991 reportaron los altos niveles en la expresión de los transcritos de C-KIT en espermatogonias y un bajo nivel en espermatoцитos en paquiteno.

Se encontró a VASA como un marcador específico de la línea germinal que se expresa en espermatogonias A1, A2, A3 y A4. *Vasa* es un marcador específico de la línea germinal, dicho gen se encuentra conservado tanto en vertebrados como invertebrados. Este gen tiene un rol determinante en la formación de las células germinales primordiales. (Castrillon y col., 2000). El gen *Vasa* se detecta en las células germinales primordiales después de la colonización de cresta gonadal y se mantiene hasta la formación de las células germinales postmeioticas (Satomi y col., 2000).

Se observó la expresión de OCT-4 en el núcleo de espermatogonias A1, A2, A3 y A4. OCT-4 es un factor de transcripción relacionado con la totipotencialidad de células madre embrionarias y células germinales. Durante el desarrollo embrionario las células pierden el patrón de expresión OCT-4, diferenciándose en líneas somáticas, mientras que la retención de la expresión, las mantiene pluripotenciales para convertirse en células germinales. Las células germinales mantienen la expresión de *Oct-4* hasta el inicio de la espermatogénesis (Pesce y col., 2000).

La identificación del marcador H3 en la proliferación de espermatogonias, se encontró positivo en el núcleo de estas células, localizadas en la base del túbulo representando

espermatogonias A1, A2, A3, A4 e intermedias. H3 se expresa en la proliferación celular en mitosis (Hans y col., 2001).

Para el marcador de meiosis SCP1, se encontró positivo en células meióticas espermatocitos en paquiteno, zigoteno, diploteno, espermatocitos secundarios y espermátides redondas. SCP1 se observa en la profase de la primera división meiótica con el apareamiento de los cromosomas homólogos, sinapsis y recombinación procesos importantes para la correcta segregación cromosómica durante la primera reducción en la meiosis I (Von Wettstein y col., 1984; Zickler y Kleckner, 1998; Page y Hawley, 2004).

WT-1 se encontró positivo a células intersticiales así como la túnica propia y el interior de los túbulos seminíferos. WT-1 juega un rol importante en la determinación sexual y esencial para el mantenimiento y desarrollo de las células en la cresta genital, el desarrollo de los túbulos seminíferos y del tracto genital. Así como la regulación de la sustancia antimülleriana y el mantenimiento de las células de Sertoli en testículos diferenciados (Gao y col., 2006). WT-1 tiene la capacidad de inducir a la proliferación o arresto celular, diferenciación celular y sexual, así como bloquear la apoptosis, a través de la activación transcripcional. El papel de WT-1 en la determinación y diferenciación sexual se debe a la activación de los genes *Sry*, *Mis*, *Sf1* y *Dax*, por la isoforma KTS (-) (Hernández y col., 2004). La expresión continua de WT-1, en testículos diferenciados sugiere un rol importante en la regulación de la hormona antimülleriana (MIS) en los testículos diferenciados (Nachtigal y col., 1998). Se detectó la presencia de hormona antimülleriana (MIS) en los testículos diferenciados, presente en toda el área del túbulo seminífero.

La especificidad y reactividad de los anticuerpos H3 (17 kDa) y Wt-1 (53 kDa) fue confirmada. Se encontraron los pesos esperados para ambas proteínas. La proteína WT-1 de 53 kDa se encuentra tanto en el sobrenadante como el precipitado de ambas especies. En cambio para H3 (17 kDa), solo se encuentra de manera marcada en los precipitados de ambas especies. La especificidad y reactividad de los anticuerpos de mayor tamaño, C-kit (145 kDa), Vasa (76 kDa) y Oct-4 (50 kDa) de ambas especies fue confirmada. Se encontraron los pesos esperados para la proteína C-KIT (145 kDa) que se expresa de manera marcada en *Artibeus jamaicensis*, no así para *Sturnira lilium*. Para la proteína VASA (76 kDa) se encuentra en ambas especies tanto sobrenadante como en el pellet aunque de manera muy tenue. En cambio para OCT-4 (50 kDa), no se encontró el peso esperado, se encontró la banda muy marcada entre los 60 kDa, la cual está presente en ambas especies.

X) CONCLUSIONES

En cuanto a las características generales de los organismos: peso, la longitud del antebrazo, el tamaño de los testículos presentan un patrón normal y en el rango de los datos reportados por otros autores para estas dos especies.

Se observó que estas dos especies tienen un patrón típico del epitelio seminífero respecto a otros mamíferos como el ratón y la rata.

El estudio morfológico de ambas especies tanto *Artibeus jamaicensis* como *Sturnira lilium*, permitió analizar la presencia de espermatogonias indiferenciadas (As, Apr, Aal), así como espermatogonias A1, A2, A3, A4, intermedias y tipo B.

Se encontró un ciclo espermatogénico completo por lo cual se identificaron todos los subtipos celulares de espermatogonias A: As, Apr, Aal, A1, A2, A3, A4, intermedias y tipo B así como espermatocitos paquiténicos, zigoténicos, espermatocitos secundarios, espermátides redondas y alargadas en diferentes grados de desarrollo así como espermatozoides.

La identificación con el marcador H3 para la proliferación de espermatogonias se encontró positivo en el núcleo de estas células, localizadas en la base del túbulo representando espermatogonias A1, A2, A3, A4 e intermedias.

Para el marcador de meiosis SCP1 se encontró positivo para células meióticas espermatocitos en paquiteno, zigoteno, diploteno, espermatocitos secundarios y espermátides redondas.

La expresión del factor de células madre C-KIT, fue detectada en la superficie celular de espermatogonias tipo A1-A4, espermatogonia tipo B, espermatocitos en preleptoteno y células de Leydig.

Se encontró a VASA como un marcador específico de la línea germinal que se expresa en espermatogonias A1, A2, A3 y A4.

Se observó la expresión nuclear de OCT-4 en espermatogonias A1, A2, A3 y A4. Como un factor de transcripción relacionado con la totipotencialidad de células madre de la línea germinal.

WT-1 se encontró positivo a células intersticiales así como la túnica propia y el interior de los túbulos seminíferos. Por otra parte se detectó la presencia de hormona antimülleriana (MIS) en los testículos diferenciados y presente en toda el área del túbulo seminífero.

La especificidad y reactividad de los anticuerpos fue confirmada por análisis "Western blot" y se obtuvieron los pesos esperados para H3 que es de 17 kDa. WT-1 de 53 kDa se encontró a los 50 kDa. La proteína de C-KIT se encontró a los 145 kDa. VASA se encontró a los 76 kDa. En cambio para OCT-4 de 50 kDa no se encontró el peso esperado, se observó una banda en los 60 kDa. Se observó que dichas proteínas están presentes en ambas especies.

Existe un ciclo continuo en la espermatogénesis debido a que son murciélagos tropicales, por lo tanto la disponibilidad de alimento cubre los requerimientos energéticos.

En el periodo colectado no se encontró rasgos de regresión ya que no hay evidencias de apoptosis, solo de estados juveniles.

XI) REFERENCIAS

- Adams I. McLaren A., (2002), Sexually Dimorphic development of mouse primordial germ cells switching from oogenesis to spermatogenesis, *Development* 129:1155-1164.
- Amiri A., Keiper B.D., Kawasaki I., Fan Y., Kohara Y., Rhoads R.E., Strome S. "An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*." *Development* 128:3899-3912(2001) [PubMed: 11641215].
- Andersen, K. (1988). A monograph of the chiropteran genera *Uroderma*, *Enchisternes*, y *Artibeus*. Proceedings of the Zoological Society of London 1908:204–319.
- Arita, H. T., Ceballos G. 1997. The mammals of Mexico: distribution and conservation status. *Revista Mexicana de Mastozoología* 2:33–71.
- Arango N. A., Lovellbadge R., Behringer R. E. (1999) Target mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter. In vivo definition of genetic path ways of vertebrates sexual development *Cel.* 99:409-419.
- Bardin C. Scherins R. J. (1982). Eds. Cell biology of the testis. Ann. N.Y. Acad. Scin. Vol. 383.
- Barlow, J. C., J. R. Tamsitt. 1968. Twinning in American leaf-nosed bats (Chiroptera: Phyllostomidae). *Canadian Journal of Zoology* 46:290–292.
- Bleier, W. J. 1979. Embryology. Pp. 379–386 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III* (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 16:1– 441.
- Birk O.S., otros 11 (2000). The LIM homebox gene LHX9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403; 909-913.
- Bouin P. Ancel P. (1903). Recherches sur les cellules interstitielles du testicule des mammiferes. *Arch de Zool Exp Gen* 1: 437–523.
- Brandes D. (1974). Male accserory sex organs. Structure and Fuction in mammals. New York. Academic press.
- Buehr M, Gu S. McLaren A. (1993), Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117:273–81.
- Byskov A. G., (1982), Primordial germ cell and regulation of meiosis, en Austin C. R., Short R. V., (Eds.), *Reproduction in mammals Germ cells and Fertilization*, 2nd Ed. London Cambridge University Press, 1-16.
- Byskov A. G., (1986), Differentiation of mammalian embryonic gonad, *Physiology rev.* 86:71-117.
- Capel B., Albrecht K. H., Washburn L. L. Eicher E. M. (1999). Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev* 84: 127131.

Castrillon D. H., Bradley J. Quade, T. Y. Wang, Catherine Quigley, Christopher P. Crum. (2000) The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage Women's and Perinatal Pathology Division, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115; Department of Obstetrics y Gynecology, Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taiwan Communicated by Jean D. Wilson, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, June 14.

Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52,198–236.

Clermont Y, Bustos-Obregon E (1968) Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted 'in toto'. *Am J Anat* 122,237–347

Cockrum E. L., Bradshaw R. G. 1963. Notes on mammals from Sonora, México. *Amer. Mus. Novitates*, 2138 1-9.

Chiarini G. H., Russell L.D. High Resolution Light Microscopic Characterization of Mouse Spermatogonia. Department of physiology Southern Illinois University School of Medicine, Carbondale, Illinois 62901, 2001.

Chiarini G. H., Meistrich L. M. High Resolution Light Microscopic Characterization of Spermatogonia. *Methods in Molecular Biology* vol. 450. Germline Stem Cells. Ed. Human Press. Totowa NJ. 2008.

Davis, W. B. 1970. The large fruit bats (genus *Artibeus*) of middle America, with a review of the *Artibeus jamaicensis* complex. *Journal of Mammalogy* 51:105–122.

Dalquest, W. W., Werner H. J., Roberts J. H. (1952). The facial glands of a fruit eating bat, *Artibeus jamaicensis* Leach. *Journal of Mammalogy* 33:102–103.

de Kretser D. M. y Kerr J. B. (1994). The cytology of the testis. en: *The Physiology of Reproduction*, Ed. por Knobil E, Neill JD, Greenwald GS, Markert CL, and Pfaff DW. New York: Raven, p. 1177–1290.

de Rooij D. G. (1998) Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 79,67–80.

de Rooij D. G., Russell L. D. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21,776–798.

de Santa Barbara P. N., Me'jean C., Boizet-Bonneaud B., Malcle's M., Berta P. and Moniot B., (2001), Steroidogenic factor-1 contribututes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression, *Biol. Reprod.* 64:775-783.

Duarte A. P. G., Talamoni S. A. (2009). Reproduction of the large fruit-eating bat *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Brazilian Atlantic forest area. *Pontificia Universidade Católica de Minas Gerais, Avenida Dom José Gaspar, 500,30535-610, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.*

Dym M. Fawcett D. W. (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intracellular bridges in the mammalian testis. *Biol. Re.*, 4:195.

Dym M., Clermont Y. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following X-irradiation of the rat testis. *Am J. Anat.*, 1970; 128:265-282.

Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S, Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. Department of Cell Biology and Physiology, Center for Research in Reproductive Physiology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15261, USA, Institute of Reproductive Medicine, University of Münster, Domagkstrasse 11, 48149 Münster, Germany

Eisenberg, J. F. (1989), *Mammals of the Neotropics, the northern Neotropics*. The University of Chicago Press, Illinois 1:1-449.

Elizondo L. H.(1999) <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=1554&-Find>.

Fleming, T. H. 1971. *Artibeus jamaicensis*: delayed embryonic development in a neotropical bat. *Science* 171:401-404.

Fenton, M. B., y col.,1992. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica* 24:440-446.

Forman, G. L., H. H. Genoways. 1979. Sperm morphology. Pp. 177-204 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*. Part III (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, TexasTech University Press 16:1-441.

Fukuda O. (1976), Ultrastructural of primordial germ cells in human embryo. *Virchows Arch* 20:85-89.

Gao F., Maiti S., Alan N., Zhang Z., Deng J.M., Berhinger R., Lecureuil C., Guillou F., Huff V. (2006) The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis.

Gannon, M.R., Willing, M.R., Knox, J. J. Jr. (1989). *Sturnira lilium*. *Mammalian Species* 333:1-5.

Gardner, A. L., C. O. Handley, JR., D. E. Wilson. 1991. Survival and relative abundance. Pp. 53-76 in *Demography and natural history of the common fruit bat *Artibeus jamaicensis* on Barro Colorado Island, Panama* (C. O. Handley, Jr., D. E. Wilson, and A. L. Gardner, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

Genoways, H. H., C. J. Phillips, R. J. Baker. 1998. Bats of the Antillean Islands of Grenada: a new zoogeographic perspective. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University* 177:1-28

Gilbert S. F. (2005) *Biología del Desarrollo* 7th ed. Medica panamericana.585-595.

Gilula N. B., Fawcett D. W. Aoki A. (1976). The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Dev Biol.* 50:142.

Hall E. R. (1981). *The Mammals of North America*. Vol. 2. John Wiley and Sons Nueva York.

Handley, C. O., JR. 1966. Descriptions of new bats (*Chiroderma* and *Artibeus*) from Mexico. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 36:297–301.

Hans F., Dimitrov S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. Laboratoire de Biologie Moleculaire et Cellulaire de la Differentiation, equipe Mecanismes d'Assemblage du Materiel Genetique,INSERM U 309, Institut Albert Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, Cedex, France.

Hamilton D. W., Greep R. O. (1975). *Handbook of physiology: endocrinology*. Vol. 5, Sec. 7, male reproductive system. Washington, DC. American Physiological Society.

Hardy M. P., Nonneman D., Ganjam V. K., Zirkin B. R. (1993). Hormonal control of Leydig cell differentiation and mature function. En: *Understanding Male Fertility: Basic and Clinical Approaches*, edited by Whitcomb R and Zirkin BR. New York: Raven, p. 125–142.

Heithaus, E. R., T. H. Fleming, P. A. Opler. 1975. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical forest. *Ecology* 56:841–854.

Hernández H.A., Aguirre C. A., Fuentes V. H., Rodríguez P. C., Trejo A. L., Zapata B.P. (2004) WT1: Sexo, Vida y Muerte. *Ciencia UANL*, Julio-septiembre, año/vol. VII, número 03 Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Pp.342-347.

Hess R. A. (1990) Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol. Reprod.* 43,525–542.

Jeon U. W., Kennedy J. R. (1973), The primordial germ cells in early mouse embryos: light and electron microscopy studies, *Dev Biol* 31:275-284.

Jones, J. K., Jr., and Carter D. C. (1976), Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. Pp. 7–38 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*. Part I (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., D. C. Carter, Eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 10:1–218.

Jones, J. K., Jr. (1978), A new bat of the genus *Artibeus* from the Lesser Antillean Island of St. Vincent. *Occasional Papers, The Museum, Texas Tech University* 51:1–6.

Jones J. K., Phillips C. J. 1976. Bats of genus *Sturnira* in the lesser Antilles *Occas papers Mus. Texas Tech University* 40:1–16.

Johnson L., Neaves W. B. (1981). Age related changes in the Leydig cell population seminiferous tubules and sperm production in syallions. *Biol. Reprod.* 9:500.

Karnovsky (M.J. Karnovsky. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*

Keast, T. L., C. O. Handley, JR. 1991. Reproduction in a captive colony. Pp. 19–42 in Demography and natural history of the common fruit bat *Artibeus jamaicensis* on Barro Colorado Island, Panamá (C. O. Handley, Jr., D. E. Wilson, and L. Gardner, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

Koubova J, Douglas B. Menke*, Qing Zhou†, Blanche Capel‡, Michael D. Griswold†, and David C. Page Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Howard Hughes Medical Institute, Whitehead Institute, and Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02142;†Center for Reproductive Biology, School of Molecular Biosciences, Washington State University, Pullman, WA 99164; and ‡Department of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710.

León G. M. A., (2007). Participación de la muerte celular por apoptosis durante la espermatogénesis en el murciélago *C. mexicanus* (Chiroptera: vespertilionidae) tesis de doctorado Universidad Autonoma Metropolitana. México D.F. pp. 120

Leydig F. (1850). Zur Anatomie der maennlichen Geschlechtsorgane und Analdruesen der Saeugethiere. *Z Wiss Zool* 2: 1–57.

Luitjens C., Gallegos M., Kraemer B., Kimble J. and Wickens M., (2000), CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes Dev.* 14: 2596–2609.

Mares, M. A., Ojeda R. A., Kosco M. P. (1981), Observations on the distribution and ecology of the mammals of Salta province, Argentina. *Annals of Carnegie Museum* 50:151–206.

Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B., (1997), Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol.* 7:958–68.

Mauduit C., Hamamah S., Benahmed M. Stem Cell Factor in Spermatogenesis Faculté de Medicine lyon-sud france, 1999.

Marx J. (1995). Mammalian sex determination Snaring the genes that divide sexes mammals. *Scien.* 269; 824-825.

McLaren A., (1994), Germline and soma: interactions during early mouse development. *Sem. Dev. Biol.*, 5:43-49.

McLaren A., Southee D. (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis *Dev. Biol.* 187;107-113.

Morigaki T., Kurohmaru M., Khanai Y., Mukohyama M., Hondo E., Yamada J., Agungpriyono S., Hayashi Y., Cycle of seminiferous epithelium in the java fruit bat (*Pteropus vampyrus*) y Japanese lesser hoseshoe bat (*Rhinolophus cornutus*) Department of veterinary anatomy, the university of Tokio. 2001.

Motta P. M., Makabe S. Nottola S. A., (1997), The ultrastructure of human reproduction, The natural history of the female germ cell: Origin migration and differentiation inside the developing ovary, Human Reproduction Update 3:281-295.

Motta P. M., Nottola S. A., Makabe S., (1997), Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 75:5-10.

Myers, P., Wezel R. M. (1983), Systematics and zoogeography of the bats of the Chaco Boreal. Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan 165:1–59.

Nachtigal, M. W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D. L., Flanagan, J. N., Hammer, G. D. & Ingraham, H. A. (1998) *Cell* **93**, 445–454.

Oliveira R. L., Oliveira A. G., Germán A.B. Mahecha, José C. Nogueira, Cleida A. Oliveira. (2009) Distribution of estrogen receptors (ERa and ERb) and androgen receptor in the testis of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* is cell- and stage-specific and increases during gonadal regression. Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Cx. Postal 486, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Ortega J. y Castro Arellano I. (2001). *Artibeus jamaicensis*. Mammalian Species. 662:1-12.

Page, S. L., Hawley, R. S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 525–558.

Pesce M., schöler H. R. *Oct-4*: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. Laboratorio di Patologia Vascolare, Istituto Dermopatico dell' Immacolata, Rome, Italy; Center for Animal Transgenesis and Germ Cell Research, Department of Animal Biology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Kennett Square, Pennsylvania, USA.

Redford, K. H., Eisenberg J. F. (1992), Mammals of the Neotropics. The southern cone. The University of Chicago Press, Illinois 2:1–430.

Ruschi A. Morcegos do Espirito Santo XIX. Familia Phyllostomatidae.

Satomi S. Tanaka, Yayoi Toyooka, Ryuko Akasu, Yuko Katoh-Fukui, Yoko Nakahara, Rika Suzuki, Minesuke Yokoyama, Toshiaki Noce Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences, Tokyo 194-8511, Japan; Laboratory of Applied Genetics, Department of Animal Resource Sciences, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo 113-0032, Japan. 2000.

Sandlow J. I., Feng H. L., Cohen M. B., Sandra A. (1996). Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue Department of Urology, University of Iowa, Iowa City 52242-1089, USA.

Tamsitt, J. R. 1966. Altitudinal distribution, ecology, and general life history of bats in the Andes of Colombia. American Philadelphia Society Yearbook 1966:372–373.

Vidal V.P., Chaboissier M.C., de Rooij D.G. y Schedl A., (2001), *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28:216–17.

von Wettstein, D., Rasmussen, S. W., Holm, P. B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18, 331– 413.

Wilson, D. E. 1979. Reproductive patterns. Pp. 317–378 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III* (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 16:1–441.

Yoshinaga k., Nishikawa S., Ogawa M., Hayashi S., Kunisada T., Fujimoto T., Nishikawa S. (1991). Role of *c-kit* in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of *c-kit* expression and function department of anatomy, kumamoto university medical school and 2department of pathology, the institute for medical immunology, kumamoto university medical school, 2-2-1 honjo, kumamoto 860, japan.

Zickler, D., and Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 32, 619 – 697.

Zetterqvist, H. (1956) The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells in the mouse jejunum. Thesis, Anatomy Dept., Karolinska Institute, Stockholm.

XII) ANEXO

Tabla de colecta de organismos.

Fecha de colecta	Número de organismos por colecta	
	<i>Artibeus jamaicensis</i>	<i>Sturnira lilium</i>
20- 21 marzo de 2009	2	2
17-18 mayo de 2009	2	1
11-13 julio de 2009	3	2
8-9 agosto de 2009	1	2
5-7 septiembre de 2009	3	3
29-30 septiembre de 2009	3	2
20 Octubre de 2009	-	3

Tabla del conteo celular *Artibeus jamaicensis*

Sertoli	espermatogonias	espermatoцитos	espermátides	Espermatozoides
3	23	23	42	
1	12	14	22	
4	9	19	31	
3	13	31		30
6	18	26	27	
7	10	32	8	
3	13	20	12	
7	8	22	13	
5		22	17	
3	13	16	9	
4	13	21	18	4
4	3	18	15	
5	4	9	10	17
6	6	17		23
7	7	9	49	54
4	7	21	8	
3	4	11	19	44
7	6	23		
3	2	16	8	40
1	15	22		
86	186	392	308	212

Tabla del conteo celular *Sturnira lilium*

Sertoli	espermatogonias	espermatoцитos	espermátides	espermatozoides
12	4	25		
10		20		
1	1		72	100

10	6	17	8	
16	5	41	23	
4		9		
4	1	10	11	2
4	3	11	14	
6	7	28	8	12
9	5	21		
10	6	17	22	60
10	1	12	2	
9	5	22	2	
9	6	26	5	
8	4	13	5	
6	8	28	8	3
9	3	33		
7	7	16		
13	3	33		
10	6	27	57	90
167	81	409	237	267

Promedio de los pesos de los testículos

<i>Artibeus jamaicensis</i>	<i>Sturnira liliu</i>
0.6	0.9
0.3	0.5
0.7	0.6
0.4	0.5
0.5	0.7
0.4	0.5
0.4	0.4
0.7	0.6
0.5	0.5875

PROMEDIO DEL DIAMETRO DE LOS TÚBULOS SEMINIFEROS

<i>Sturnira liliu</i>	<i>Artibeus jamaicensis</i>
103.5	137
81	134
96	126
89.5	116
101	125
99	132
95	144
83	123
101	129
83	121
78	132
81	135
103	126
89	119

110	113
92	120
96	119
99	102
119	104
100	103
94.8	123

MICROSCOPIA ELECTRONICA TEM / DE ALTA RESOLUCION

- 1) Disección y fijación del tejido en buffer karnovsky (Karnovsky, 1965) sin calcio (pH 7.4)
- 2) Se colocaron en una solución buffer de cacodilatos de sodio (0.1 m) durante 1 hora.
- 3) Se postfijan con tetroxido de osmio (OsO_4) al 1% en buffer de Zetterqvist (Zetterqvist, 1956).
- 4) Lavado con agua destilada 5 minutos
- 5) Alcohol 70 % 10 minutos
- 6) Alcohol 80 % 10 minutos
- 7) Alcohol 90 % 10 minutos
- 8) Alcohol 96 % 10 minutos
- 9) Alcohol 100 % 15 minutos
- 10) Alcohol 100 % 15 minutos
- 11) Oxido de acetonitrilo 20 minutos
- 12) Oxido de acetonitrilo 20 minutos
- 13) Oxido de acetonitrilo-epon 1:1 1 hora
- 14) Oxido de acetonitrilo-epon 1:2 1 hora
- 15) Epon puro durante 24 horas.
- 16) Inclusión en epon 812 puro y polimerizar a 60 C overnight.
- 17) Realizar los cortes en ultramicrotomo 1-2 micras y teñir con azul de toluidina.
- 18) Observar al microscopio.

INMUNOHISTOQUIMICA

- 1) fijación del tejido en PFA al 4% durante 20 minutos.
- 2) Mantener en una solución sacarosa al 30 % overnight a 4 °C.
- 3) Incluir el tejido en capsulas beem con tissue-tek.
- 4) Realizar los cortes en el criostato 15-20 micras con laminillas poli L- lisina.

- 5) Vacio durante una hora.
- 6) Lavado con PBS 1x durante 10 minutos.
- 7) Lavado con triton x 100 al 1% en PBS durante 10 minutos.
- 8) Lavado con PBS 1x rápido.
- 9) Bloquear con albumina al 1% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 10) Incubar con el anticuerpo primario overnight a 4 °C.

<i>Artibeus jamaicensis</i>					
Anticuerpos			Fluoróforos		
H3			CY5		
C-kit			CY5		
Oct4			CY5		
SCP1			CY5		
H3	SCP1		CY5	Rodamina	
H3	C-kit	Vasa	CY5	Rodamina	FITC
H3	Oct4	Vasa	CY5	Rodamina	FITC
H3	SCP1	Vasa	CY5	Rodamina	FITC
H3	C-kit	Oct4	CY5	Rodamina	FITC
Wt-1	MIS	Vasa	CY5	Rodamina	FITC

<i>Sturnira lilium</i>					
Anticuerpos			Fluoroforos		
H3			CY5		
C-kit			CY5		
Oct4			CY5		
SCP1			CY5		
H3	SCP1		CY5	Rodamina	
H3	C-kit	Vasa	CY5	Rodamina	FITC
H3	Oct4	Vasa	CY5	Rodamina	FITC
H3	SCP1	Vasa	CY5	Rodamina	FITC
H3	C-kit	Oct4	CY5	Rodamina	FITC
Wt-1	MIS	Vasa	CY5	Rodamina	FITC

- 11) 4 Lavados con PBS 1x durante 5 minutos.
- 12) Lavado con albumina 1% durante 5 minutos.
- 13) Incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora T.A.
- 14) 4 Lavados con PBS 1x durante 5 minutos.
- 15) Inmunohistoquímica sencilla se montan con DAKO
Dobles o triples sigue:
16) Se postfijan con PFA. Al 4 % durante 15 minutos.
17) 4 Lavados con PBS 1x durante 5 minutos.
18) Se repite desde el paso 7.

ANTICUERPOS INMUNOHISTOQUIMICA

Anticuerpos	Especie	Marca/ Catalogo	Concentración
C-kit (C-19)	Conejo	Santa Cruz (sc 168).	1: 200
Vasa	Conejo	Abcam (ab 13840-100)	1: 500
OCT4.	Conejo	Abcam (ab19857)	1:250
SCP1.	Conejo	Abcam (ab15090)	1: 250
H3	Conejo	Upstate (06-570)	1:200
Wt-1 (C-19)	Conejo	Santa Cruz (sc 192).	1: 100
MIS (C-20)	Cabra	Santa Cruz (sc 6886).	1: 250

WESTERN BLOT

Extracción de proteínas

- 1) Se maceraron ambos testículos de *Sturnira liliium* y *Artibeus jamaicensis* en 200 µl de PBS 1x, 100 µl de buffer ripa y 5 µl de inhibidores de proteasas en mortero a 4°C.
- 2) se incubaron por 20 minutos en hielo y se centrifugo a 12000 revoluciones por 15 minutos a 4 °C.
- 3) Se obtuvo el sobrenadante y el pellet, se mantuvieron a -20 °C para su posterior cuantificación por el método Lowry modificado.

Cuantificación método Lowry (modificado).

Curva Rango .5 a 5. Stock 10 µg/ml BSA. Agua bidestilada

valores	Stock BSA	Agua bidestilada
0.5	10 µl	190 µl
1	20 µl	180 µl
2	40 µl	160 µl
3.	60 µl	140 µl
5	100 µl	100 µl

Relacion :

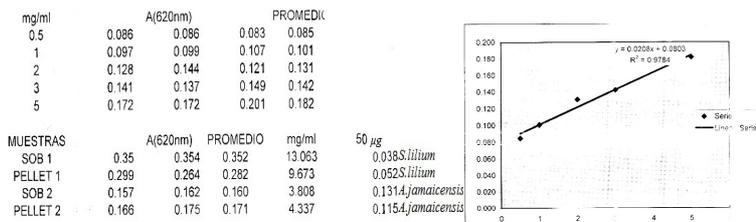
10 µg/ml (X) = .5 µg / ml (200 µl)

$X = (.5 \mu\text{g} / \text{ml} (200 \mu\text{l})) / 10 \mu\text{g} / \mu\text{l} = 10 \mu\text{l}$

Muestras:

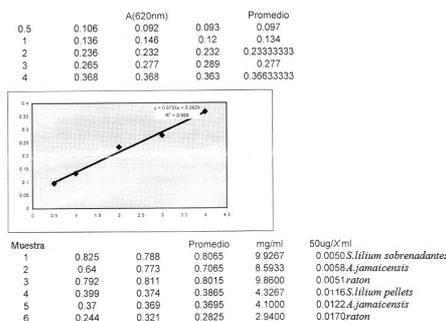
- 1) Tomar 5 µl de muestra y 25 µl de A´ = 1 ml de reactivo A + 20 µl reactivo S
- 2) Agitar
- 3) Poner 200 µl de reactivo B
- 4) Agitar
- 5) 15 minutos de incubación
- 6) Quitar 100 µl y leer a 620 nm. lector de Elisa.
- 7) Cuantificación de proteínas por Elisa para western blot.

Cuantificación de proteínas de machos adultos (*Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*).



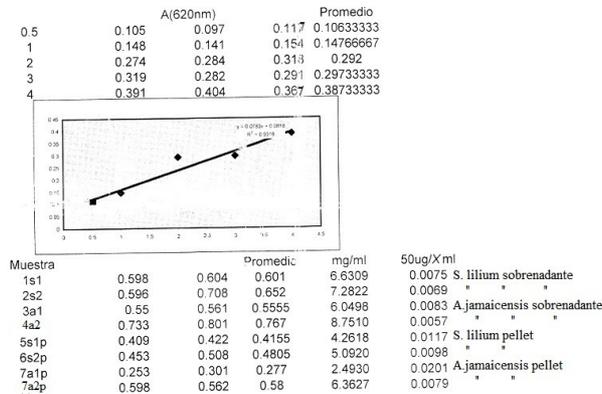
Cuantificación de proteínas para western blot por el método lowry modificado

Segunda repetición machos adultos de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*.



Cuantificación de proteínas para western blot por el método lowry modificado

Tercera repetición machos adultos de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*.



Gel poliacrilamida-bisacrilamida desnaturalizante (SDS-page).

Gel separador	7.5 %	15%
acilamida/ bis	2 ml	4 ml
1.5 M tris HCl PH 8.8	2 ml	2 ml
Agua bidestilada	3.84 ml	1.84 ml
APS (ul)	80 µl	80 µl
TEMED (ul)	10 µl	10 µl

Gel poliacrilamida-bisacrilamida desnaturalizante (SDS-page).

Gel concentrador	7.5 % y 15 %
acilamida/ bis	1.95 ml
Tris 0.5 M PH 6.8	3.75 ml
Agua bidestilada	9 ml
APS (ul)	150 µl
TEMED (ul)	15 µl

- 1) Se cargaron las muestras con buffer pironina y marcador de peso molecular kaleidoscope de Bio-rad, los geles se corrieron a 120 v ~ 2 horas.
- 2) Se realizo la transferencia a membranas PVDF previamente activada con metanol por 10 minutos.

- 3) Los geles fueron inmersos en buffer de transferencia así como las toallas y las membranas con la ayuda de transblot se transfirieron por 40 minutos a 400 mA.
- 4) Posteriormente se bloquearon las membranas por 1 hora PBS-BSA al 3 %.
- 5) Y se incubaron con el anticuerpo primario en PBS-TWEEN toda la noche.

Anticuerpos para western blot	Especie	Marca/ Catalogo	Concentración
C-kit (C-19)	Conejo	Santa Cruz (sc 168).	1: 500
Vasa	Conejo	Abcam (ab 13840-100)	1: 500
Oct-4.	Conejo	Abcam (ab19857)	1:500
H3	Conejo	Upstate (06-570)	1:500
Wt-1 (C-19)	Conejo	Santa Cruz (sc 192).	1: 500

- 6) Se realizaron 2 lavados PBS_TWEEN por 5 minutos
- 7) Se realizo 1 lavado PBS 1x.
- 8) Se incubo con anticuerpo secundario antirabbit por 1 hora
- 9) Se realizaron 2 lavados PBS_TWEEN por 5 minutos
- 10) Se realizo 1 lavado PBS 1x.
- 11) Se reveló con tetracloruro de diaminobenzidina (DAB) y se detuvo la reacción con agua.

REACTIVOS

DAB	BUFFER RIPA	PBS TWEEN	Gel
10 ml pbs tween 10 µl peroxide DAB	Tris 50 µM NaCl 150 µM NP40 1% dioxicolato de Na 0.5 %. Buffer transferencia al 20 % metanol PBS	750 µl Tween 250 ml PBS 1x	Tris 1.5 M PH 8.8 Tris 36.33 g – 200ml SDS 10 % Acrilamida 30 % Bis acrilamida 0.8% APS 10%. Tris .5 M ph 6.8 tris 6g – 100 ml SDS 10%