



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DEL
TESTÍCULO DEL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO**
Artibeus jamaicensis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARIA GUADALUPE RUIZ MAR



DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

México D.F. enero 2014



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Ruiz

Mar

Maria Guadalupe

59 14 12 00

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307149569

2. Datos del tutor

Dra.

Norma Angélica

Moreno

Mendoza

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Horacio

Merchant

Larios

4. Datos del sinodal 2

Dra

Maricela

Villagrán

Santa Cruz

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Héctor Maximino

Rodríguez

Magadán

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Adriana

García

Alarcón

7. Datos del trabajo escrito

Estudio morfológico y molecular del testículo del
murciélago frugívoro *Artibeus jamaicensis*

87 p

2014

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias donde curse la carrera de Biología

Al departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas donde se realizó el trabajo de investigación teniendo como tutora la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

A el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica

(PAPIIT-UNAM no. IN205011).

A los miembros del jurado:

Dr. Horacio Merchant Larios

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Dr. Héctor Maximino Rodríguez Magadán

M. en C. Adriana García Alarcón.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza por la asesoría en el trabajo, así como sus consejos y apoyo incondicional en toda la estancia que me abrieron paso en el comienzo de mi carrera dirigida hacia la investigación.

Dr. Héctor Maximino Rodríguez Magadán y Dra. Nivia Rocio Antonio Rubio por su asesoría en la realización de las técnicas de biología molecular.

M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia por su apoyo técnico en la microscopia electrónica.

M. en C. Alma Lilia Álvarez Guerrero por su apoyo teórico en aspectos de reproducción y por su gran amistad a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio Alma, Alberto, Israel, Crycel, Adriana, Rocio, Héctor, Sandy, Andrea, Claudia, Eva, Bárbara por su amistad y apoyo en todo momento.

A todos mis amigos que han formado parte de mi vida en todos los aspectos. Por todos aquellos momentos que hemos pasado y que me han enseñado muchas cosas.

A mis padres

Sin ellos nunca lo hubiera logrado, les agradezco todo el apoyo a lo largo de mi carrera y en esta última etapa, siendo mi motivación en cada prueba que la vida me ponga.

A mis hermanas

Que siempre me incitan a seguir delante de la mejor manera posible.

A David P.

Compañero de vida que ha sido y será mi fuente de inspiración y motivación,

INDICE	Pág.
Resumen	
Introducción	
1. Aparato genital masculino	
1.1 Testículos	2
1.2 Túbulos rectos y rete testis	6
1.3 Conductos deferentes	7
1.4 Epididimo y conductos deferentes	7
1.5 Glándulas sexuales accesorias	7
1.6 Pene	7
1.7 Escroto	8
2. Espermatogénesis	8
3. Esteroidogénesis del testículo	11
4. Ciclo del epitelio seminífero	12
5. Genes involucrados en la morfogénesis testicular	13
6. Reproducción en mucíelagos	15
7. Características de la especie	
7.1 Distribución, hábitat y alimentación	16
7.2 Fisiología	18
7.3 Reproducción	18
Antecedentes	20
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos	22
Material y Métodos	
1. Colecta de los individuos	23
2. Obtención de muestras	23
3. Microscopía de campo claro y electrónica	24
4. Inmunofluorescencia	24
5. Biología molecular	26
Resultados	
1. Características macroscópicas	29
2. Estructura del testículo	30
3. Microscopía de campo claro	30
4. Ultraestructura del testículo	36
5. Ciclo del epitelio seminífero	50

6. Detección de proteínas	54
7. Biología molecular	61
Discusión	
1. Características macroscópicas	63
2. Estructura del testículo	63
3. Expresión de genes	64
4. Estacionalidad	67
Conclusiones	70
Bibliografía	71

RESUMEN

Artibeus jamaicensis es un murciélago frugívoro de la familia *Phyllostomidae* con una amplia distribución en América Central. Presenta un arco cigomático completo, ausencia de cola y una estrecha membrana interfemoral, dos líneas faciales blanquecinas, así como una hoja nasal característica de la familia. En los machos adultos la talla de los testículos está relacionada con la espermatogénesis y llegan a ser grandes durante el estro postparto de las hembras. El presente trabajo analiza la morfología y el patrón de expresión de genes del testículo del murciélago *A. jamaicensis* característicos de otros mamíferos en las cuatro estaciones del año. Los ejemplares se sacrificaron por una sobredosis de anestesia y se tomaron medidas macroscópicas (peso del organismo, morfometría, diámetro escrotal, longitud del testículo); se disectaron ambos testículos y procesaron para microscopia de campo claro, electrónica, inmunofluorescencia, RT-PCR y western blot. El testículo presentó una morfología similar a la de los mamíferos con una espermatogénesis de tipo radial con espermatogonias que se van diferenciando a espermatozoides hacia la luz del túbulo seminífero. En relación a las asociaciones que presenta, se encontraron nueve etapas del ciclo del epitelio seminífero de acuerdo al sistema acrósomico. Por medio de microscopia electrónica de transmisión pudo identificarse perfectamente el proceso espermatogénico que va de una espermatogonia, pasando por espermatocito, espermátida y finalmente los espermatozoides. Con respecto a la expresión de genes relacionados con la función testicular en vertebrados, se encontró que al igual que en otros mamíferos, la proteína Vasa se encuentra en el citoplasma de las espermatogonias que están localizadas más cercanas a la membrana plasmática de los túbulos, así como c-Kit en el núcleo de estas mismas células. La proteína Sox9 se localizó en el núcleo de las células de Sertoli, evidenciando que es un gen altamente conservado en la fisiología de los testículos. La proteína cromosomal p3, siendo un marcador de proliferación, se detectó sólo en algunas espermatogonias, evidenciando actividad proliferativa de este linaje celular en el testículo. La expresión de las proteínas se observó en el túbulo seminífero durante las cuatro estaciones del año, evidenciando un proceso espermatogénico activo que se corrobora al observar producción de espermatozoides localizados en el lumen del túbulo. Se puede aceptar que los machos de *Artibeus jamaicensis* colectados en Yauhtepec, Morelos están reproductivamente activos todo el año sin importar las condiciones climáticas o las condiciones reproductivas de las hembras.

INTRODUCCIÓN

1. Aparato genital masculino

El aparato genital masculino se divide en órganos sexuales internos que comprenden: los testículos, epidídimos, conductos deferentes y las glándulas sexuales anexas que son las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales (éstas también pueden considerarse como genitales externos). Los genitales externos comprenden el pene y el escroto (Geneser F.1993).

1.2 Testículos

Los testículos son órganos pares que varían considerablemente en tamaño y forma entre las diferentes especies. Son considerados los órganos reproductivos primarios en el macho, ya que producen los gametos masculinos (espermatozoides) y el andrógeno testosterona (Senger 2003). La testosterona es esencial en el adulto para el mantenimiento de la producción de los espermatozoides y para el mantenimiento de las características sexuales secundarias, los conductos genitales y glándulas anexas (Ross M. 1997). Los testículos producen también inhibidores, estrógenos y una variedad de proteínas importantes en la función espermática, así como también fluidos que actúan como un vehículo por el cual el espermatozoide permanece suspendido y es transportado fuera de los testículos (Senger 2003).

Cada testículo está recubierto por una cápsula testicular compuesta de dos capas: la túnica vaginal visceral y la capsula de tejido conectivo conocida como túnica albugínea (tejido conectivo fibroso), la cual envía proyecciones en el parénquima del testículo, las cuales se unen al mediastino en la parte posterior del testículo. Dicha cápsula presenta ciclos rítmicos de contracción y relajación que sirven para facilitar el movimiento de los espermatozoides en la rete testis y los conductos eferentes (Senger 2003).

La unidad funcional del testículo es el túbulo seminífero, que se componen de un epitelio seminífero rodeado por una túnica propia (Ross M. 1997). El epitelio seminífero es un complejo epitelio estratificado compuesto por dos poblaciones básicas de células: las células espermatogénicas (espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides) y las de Sertoli. En el espacio intersticial entre los túbulos seminíferos se encuentran células mioides, vasos sanguíneos, tejido conectivo, vasos linfáticos, nervios, fibroblastos, macrófagos y células de Leydig. Los túbulos están encerrados en un tejido peritubular que comprende la membrana basal y una capa (en ratas) o varias (en humanos) de células mioepiteliales o miofibroblastos intercaladas con capas de fibras de colágeno y matrices de glicosaminoglicanos y proteoglicanos. La membrana basal generalmente consiste internamente de un material filamentoso y una red externa de fibras reticulares. Las células mioides exhiben contracciones que contribuyen al movimiento de los espermatozoides y el fluido a través del confinamiento luminal de los túbulos seminíferos (Skinner and Fritz, 1986; Hettle *et al.*, 1988; Maekawa *et al.*, 1996; Johnson L. 2008).

Epitelio germinal

El epitelio germinal en el túbulo seminífero se compone del linaje germinal implicado en la formación de los gametos masculinos:

- Espermatogonias: Las células precursoras se dividen para formar una célula precursora de reemplazo y para proporcionar una población de espermatogonias comprometidas (Ross M. 1997). Se encuentran muy cerca de la lámina basal y son el punto de partida para la espermatogénesis. Pueden distinguirse tres tipos:
 - ✓ Espermatogonias tipo A: Célula germinal primordial (CGP) se divide para formar espermatogonia tipo A_1 , la cual presenta un núcleo ovoide que contiene cromatina asociada a la membrana nuclear, este tipo celular se encuentra adyacente a la membrana basal, y es considerada célula madre ya que es capaz de auto renovarse o formar el siguiente tipo celular denominado espermatogonia A_2 , la cual se divide se dividen para producir las espermatogonias tipo A_3 y estas a su vez forman las tipo A_4 . Es posible que todas las espermatogonias tipo A-sean capaces de auto-renovarse y al dividirse no presentan diferencias morfológicas (Gilbert 2006).
 - ✓ Espermatogonias intermedias: La espermatogonia tipo A_4 se puede diferenciar en el primer tipo celular comprometido, la espermatogonia intermedia. Este tipo celular se divide mitóticamente para formar la espermatogonia tipo B y queda determinada a ser espermatozoide (Gilbert 2006).
 - ✓ Espermatogonias tipo B: Son células diferenciadas que no retroceden al estadio de células madre. Tienen núcleo redondo con gránulos de cromatina de tamaño variable y un único nucléolo de ubicación central (Geneser F. 1993). Son las precursoras de los espermatoцитos y son las células tardías en la línea sometida a mitosis (Gilbert 2006).
- Espermatoцитos primarios: Se diferencian por la división mitótica de las espermatogonias tipo B. Se desplazan hacia la luz y van aumentando de tamaño en forma considerable. Replican su DNA poco después de su formación para posteriormente entran en la primera división meiótica, estadio durante el cual la cromatina se condensa a cromosomas visibles durando hasta 22 días en humanos (Geneser F. 1993; Ross M. 1997).
- Espermatoцитos secundarios: Ingresan de inmediato a la profase de la segunda división meiótica sin síntesis de ADN nuevo. Son notablemente más pequeños que los primarios. Su núcleo es redondo y contienen gránulos de cromatina gruesos (Geneser F. 1993; Ross M. 1997).
- Espermátidas: Son células haploides dispuestas en la zona luminal del epitelio seminífero y presentan un núcleo muy claro de ubicación excéntrica. Sufren un proceso de maduración que da lugar al espermatozoide maduro (Geneser F. 1993; Ross M. 1997).

En dicho proceso la célula se va alargando, pierde citoplasma y forma el acrosoma.

- Espermatozoides: Su cabeza es aplanada y cónica, el acrosoma cubre los dos tercios anteriores del núcleo y contiene enzimas acrosómicas esenciales para el paso de la zona pelúcida del ovocito. La pieza media contiene mitocondrias enrolladas en forma helicoidal alrededor del complejo axonémico, las cuales proporcionan la energía necesaria para los movimientos del flagelo. La pieza principal contiene la vaina fibrosa externa a las fibras gruesas y el complejo axonémico formado de dos microtúbulos simples rodeados por 9 microtúbulos dobles 9+2. La pieza terminal representa la parte final del flagelo y solo contiene el complejo axonémico (Rooss M. 1997).

Células de Sertoli

Las células de Sertoli juegan un papel mayor en la regulación de la espermatogénesis y alteran la velocidad de producción de espermatozoides. Las funciones de las células de Sertoli incluyen el proporcionar soporte estructural y nutrición a las células germinales en desarrollo, la fagocitosis de células germinales en degeneración y cuerpos residuales, la liberación de espermátidas para la espermiación y producción de un huésped de proteínas que regulan y/o responden a la liberación de la hormona pituitaria y que influencia la actividad mitótica de la espermatogonia. (Amann, 1970; Dym and Raj, 1977; Feig *et al.*, 1980; Jutte *et al.*, 1982, 1983; Tres *et al.*, 1986; Buch *et al.*, 1988; Bellve and Zheng, 1989; Johnson, 1991; Russell and Griswold, 1993; Johnson L. 2008).

La expresión de varios genes en las células de Sertoli es regulada por factores de desarrollo, así como de factores endocrinos y parácrinos específicos. Los productos de genes importantes se han colocado en cuatro categorías principales (Griswold M.1993, 1998):

- I. Proteínas de transporte o bioprotectoras: tales como la proteína ligadora de andrógenos (ABP) o transferrina (Griswold M.D.1998). Con ello se da la idea de que una función principal de las células de Sertoli es el transporte de nutrientes importantes y factores reguladores alrededor o a través de las barreras de unión a las células germinales secuestradas.
- II. Proteasas e inhibidores de proteasas (Fritz I.B.1993): La célula de Sertoli secreta diferentes proteasas e inhibidores, y una de éstas funciones está involucrada en la extensa remodelación de tejido que ocurre cuando las uniones estrechas pueden ser atravesadas o cuando un espermatozoide es liberado del epitelio seminífero.
- III. Glicoproteínas de membrana: tales como el receptor de la hormona folículo estimulante (FSH) (Kumar T.R.1997; Heckert L. 2002) y los componentes de los complejos de unión entre las células de Sertoli adyacentes o entre células germinales y Sertoli (Risley M. 2000; Gow A. 1999; Batias C. 2000; Batias C. 1999)

- IV. Factores de crecimiento y factores parácrinos: el ligando c-Kit (Grimaldi P. 2003; Marziali G. 1993; Tajima Y. 1991; Rossi P. 1991; Grimaldi P. 2002) y la sustancia inhibidora Mulleriana (MIS) (Lukas-Croiser C. 2003; Tremblay J. 2001; Watanabe K. 2000).

La célula de Sertoli es columnar en altura, se une a la membrana basal por hemidesmosomas extendiéndose al lumen (Russell L. and 1993). Lleva a cabo su funcionamiento mediante la exención de su citoplasma en procesos parecidos a brazos alrededor de las células germinales en desarrollo, formando complejos de unión especializados que consisten en uniones tipo gap y estrechas, filamentos de actina, y retículo endoplásmico liso (McGinley D.1979; Russell L. 1980;1979; 1977; Russell L. and Clermont Y. 1976) (Hess R., Franca L. 2005). Su núcleo es grande (250-850 μm^3) y muestra una envoltura nuclear porosa, dándole una forma irregular piramidal, triangular y planoconvexa (Russell L. and Clermont Y. 1976), el nucléolo es grande, fácilmente reconocible y tripartito (Guttenbach M. 1996; Kushida T. 1993)

El citoplasma contiene una abundancia de mitocondrias, lo cual es indicativo de su alta actividad metabólica (Russell L. 1993). El retículo endoplásmico liso es un organelo predominante, sugiriendo que la célula tiene una función relacionada al metabolismo de lípidos y esteroides (Hess R., Franca L. 2005). Al tener una función fagocítica y de remoción del citoplasma de espermatidas a través del complejo tubulobulbar y por fagocitosis, los cuerpos residuales y las células germinales en degeneración conducen a la formación de lisosomas y cuerpos multivesiculares que están localizados en el citoplasma. El aparato de Golgi es relativamente pequeño en la célula de Sertoli, y los múltiples componentes están típicamente dispersos en la región supranuclear (Hess R., Franca L. 2005). Los elementos primarios del citoesqueleto incluyen microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios (vimentina). Estos elementos están envueltos en un número de actividades asociadas con el anclaje y translocación de las células germinales, a través de diferentes etapas de desarrollo, crianza y preparación para la liberación de espermatidas al lumen del túbulo (Guttman J. 2002; Mulholland. D.2001; Vogl A.2000; Guttman J.2000; Miller M. 1999; Beach S. 1999; Vogl A, 1996; Vogl A. 1995)

Un tipo de apoyo estructural característico de las células de Sertoli para las células germinales en desarrollo es la barrera hematotesticular que reside en uniones estrechas entre las de Sertoli adyacentes. Esta barrera separa las espermatogonias y espermatoцитos primarios en preleptoteno temprano dentro del compartimento basal y espermatoцитos secundarios y espermatidas en el compartimento adluminal. Esta disposición estructural crea una barrera inmunológica mediante el aislamiento de las células germinales más avanzadas (espermatoцитos y espermatidas) del sistema inmune de modo que sus antígenos no estimulan la autoinmunidad, dicha barrera continua dentro del conducto epididimario (Johnson L. 2008).

Todas las sustancias de naturaleza nutricional o regulatoria pasan a través del citoplasma de las células de Sertoli que está disponible para las células germinales colocadas dentro del compartimento adluminal (Guraya 1995).

Células de Leydig

Células descubiertas por Franz Leydig (1850). Las células de Leydig, quienes representan la parte endócrina del testículo. Son grandes, poligonales, acidófilas, y contienen inclusiones lipídicas. Su núcleo es grande y redondo, a menudo de localización excéntrica. Al igual que otras células secretoras de esteroides, poseen un elaborado retículo endoplásmico liso, en el que están relacionadas las enzimas necesarias para la síntesis de testosterona a partir del colesterol y mitocondrias con crestas tubulovesiculares (Geneser 1993; Ross M. 1997). Las Leydig son análogas a las células internas de la teca folicular en el ovario, contienen receptores de membrana para la hormona luteinizante (LH) y cuando esta se une al receptor, las células producen progesterona, la cual es convertida en testosterona (Senger 2003). La testosterona es necesaria para el mantenimiento del desarrollo de las células germinales y la fisiología normal de las células de Sertoli en el epitelio seminífero, así como para el mantenimiento de la adhesión de las espermátidas elongadas en el testículo, en particular en la parte apical (Yan C. *et al.* 2010).

La LH induce también la síntesis de cAMP, el cual, cataliza la síntesis de proteína cinasa A, necesaria para el transporte de colesterol del citoplasma a la mitocondria por medio de estructuras celulares de almacenaje (gotas lipídicas). La proteína reguladora de esteroidogénesis (StaR) y el receptor benzodiazepínico tipo periférico (PBR) transfieren el colesterol de la membrana externa a la membrana interna mitocondrial (Hauet T. *et al.* 2002). La enzima P450 reside en la matriz de la membrana interna mitocondrial donde convierte el colesterol en pregnenolona, la cual es finalmente transferida al retículo endoplásmico liso (REL), donde la testosterona se sintetiza por una serie de enzimas esteroidogénicas (The Endocrine Society, 2007).

1.2 Túbulos Rectos y Rete Testis

Cerca del mediastino testicular, los túbulos seminíferos continúan con un corto segmento terminal donde el epitelio se compone exclusivamente de células de Sertoli. En la transición a túbulos rectos se hace más angosta la luz y el epitelio se hace cilíndrico bajo. Los túbulos rectos son muy cortos y desembocan en la rete testis, la cual se compone de un laberinto de conductos anastomosados ubicados en el mediastino testicular revestidos de epitelio cubico aplanado o plano (Geneser F. 1993).

1.3 Conductos eferentes

La rete testis está vinculada al conducto epididimal por los conductos eferentes que aparecen desde la parte superior y posterior del testículo atravesando la túnica albugínea. Estos conductos forman un cordón que está anatómicamente diferenciado en una zona proximal (inicial), donde los conductos individuales corren paralelos entre sí; y una zona distal donde el curso de los conductos es más sinuoso. Estos conductos o bien, se unen para formar un conducto común, o se abren directamente en el conducto del epidídimo (Geneser F. 1993; Senger 2003).

1.4 Epidídimo y conductos deferentes

El epidídimo es un tubo muy sinuoso, organizado en lóbulos que termina en el conducto deferente que está revestido por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado (Senger 2003). El transporte de espermatozoides a lo largo del epidídimo es afectado por su túnica de músculo liso y se produce en el segmento inicial de la cabeza y en la primera parte del cuerpo por contracciones peristálticas espontáneas de las células musculares lisas, aquí el transporte es lento y constante, siendo el segmento medio asiento de la maduración final de los espermatozoides. La parte caudal del conducto, denominada segmento caudal es el sitio de almacenamiento de los espermatozoides maduros (Geneser F. 1993; Senger 2003).

El conducto deferente corre a lo largo del borde posterior del testículo y sigue al cordón espermático hasta el conducto inguinal. Luego se orienta hacia la base de la próstata y se une con el conducto excretor de la vesícula seminal constituyendo el conducto eyaculador que atraviesa la próstata para desembocar en la porción prostática de la uretra (Geneser F. 1993).

1.5 Glándulas sexuales accesorias

Las glándulas sexuales accesorias surgen en parte del conducto de Wolff y en parte de la uretra prostática y el pene. Las glándulas seminales se desarrollan como divertículos, el área del epitelio secretor se incrementa por la formación de pliegues vellosos. La próstata y las glándulas bulbouretrales (o de Cowper) surgen de la uretra proximal y distal respectivamente, como glándulas secretoras alveolares. La próstata puede ser lobular o diseminada dependiendo de la especie. La secreción de las glándulas sexuales accesorias contiene diversas sustancias como la fructosa, ácido cítrico, el zinc y la fosfatasa ácida que se agregan al semen en la eyaculación.

1.6 Pene

En todos los mamíferos, el semen es depositado en el tracto reproductivo de la hembra por un órgano copulador: el pene. Hay dos tipos básicos de penes: un pene vascular como en la mayoría de los grupos incluyendo los primates, y un pene fibroelástico como en artiodáctilos (jirafa, hipopótamo).

1.7 Escroto

El escroto es esencialmente una evaginación de la piel, pero esto es a menudo muy diferente de la piel en otras partes del cuerpo. Debajo de la piel hay una capa de músculo liso, la túnica dartos, que se contrae en respuesta al frío y mueve los testículos hacia arriba hacia la pared del cuerpo; mientras que en un ambiente cálido se relaja para aumentar el área de superficie del escroto hasta un 20 % (Senger 2003). Dentro del escroto la temperatura de los testículos es de 2-3 °C inferior a la temperatura corporal (Ross M. 1997).

2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de transformación bioquímica, morfológica y de división celular de las células germinales, es decir, de células madres diploides a espermatozoides haploides elongados; este proceso toma lugar dentro de los túbulos seminíferos, específicamente en el epitelio seminífero y está conectado de manera importante por uniones intercelulares (Lin W. *et al.* 1997).

Durante las divisiones de espermatogonia tipo A₁ a espermátida, las células se mueven más lejos de la membrana basal del tubo seminífero y más cerca del lumen (Siu and Cheng 2004; Gilbert S. 2006). Cada tipo celular puede encontrarse en una capa particular del tubo. Las espermátidas que se localizan en el borde del lumen pierden sus conexiones citoplásmicas y se diferencian en espermatozoides (Figura 1).

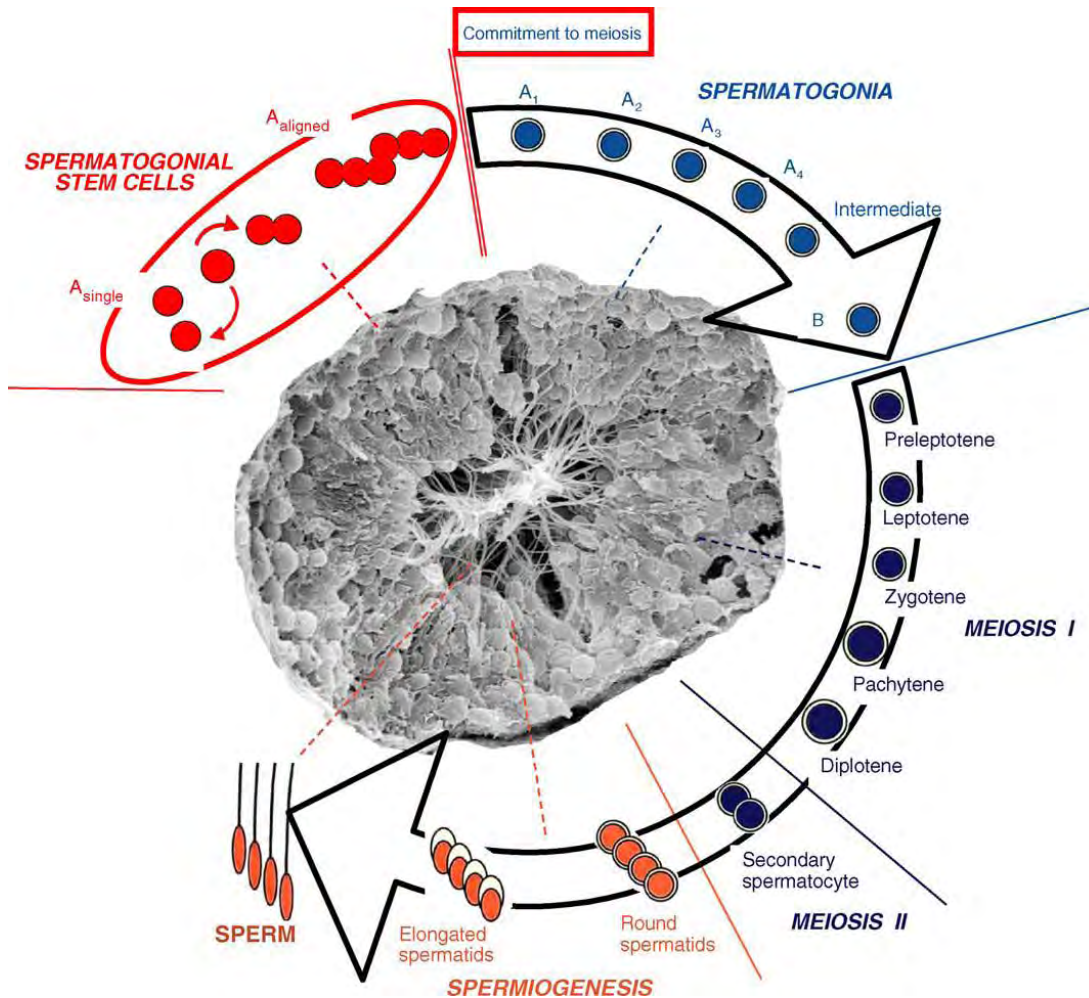


Figura 1. Espermatogénesis. Las células madres de las espermatogonias, sus compartimentos post-meióticos y su localización en el túbulo seminífero. Se presentan las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero. (Tomada de Olive Virginie and Cuzin Francois, 2004)

Este proceso puede subdividirse en tres fases:

1. **FASE DE PROLIFERACIÓN:** Consiste de todas las divisiones mitóticas de la espermatogonia localizadas en compartimento basal del epitelio seminífero. De acuerdo a las diferentes divisiones se pasa de la espermatogonia A_1 - A_4 , espermatogonia I (intermedia) y la B para dar lugar a los espermatocitos (Chocu S. 2012) manteniendo simultáneamente su número por autorenovación.
2. **FASE MEIÓTICA:** Involucra a los espermatocitos primarios y secundarios para dar como resultado espermatidas haploides. En esta fase, las divisiones mitóticas de espermatogonias tipo B resulta en la formación de espermatocitos primarios, los cuales inmediatamente entran en la primera profase meiótica (preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno).

3. FASE DE DIFERENCIACIÓN O ESPERMIOGÉNESIS: Una espermátida indiferenciada sufre continuas transformaciones que resultan en la producción de espermatozoides diferenciados, estructurados por una cabeza (material nuclear), un flagelo que incluye una parte media (con mitocondrias en forma de hélices) y una pieza principal. En este proceso, hay un alta condensación nuclear, se forma el acrosoma y la células tienen una alta motilidad, esto requiere de un flagelo y de las hélices mitocondriales; esta diferenciación consiste de:

- **Fase Golgi:** caracterizada por el primer paso del desarrollo acrosomal. El aparato de Golgi está formado por vesículas proacrosomales, las cuales se fusionan generando una gran vesícula que reside cerca del núcleo llamada vesícula acrosomal, la cual contiene un granulo cromosómico denso; posteriormente, los centriolos migran del citoplasma a la base del núcleo y el centriolo proximal forma el punto de unión del flagelo y el núcleo. El centriolo distal da lugar al desarrollo del axonema, es decir, la porción central del flagelo (Senger 2003).
- **Fase cap:** El acrosoma forma una capa o cubierta sobre la porción anterior del núcleo. El aparato de Golgi tiene la función de empaquetar el contenido acrosomal alejándose del núcleo hacia la zona caudal de la espermátida y eventualmente desaparece (Senger 2003).
- **Fase acrosomal:** El acrosoma continúa extendiéndose hasta cubrir dos terceras partes de la región anterior del núcleo. El núcleo comienza a elongarse y desplazarse a la región posterior de la espermátida. Un único sistema de microtúbulos conocido como machete se desarrolla cerca del área posterior del núcleo. El machete se forma en la región media caudal del núcleo y se extiende hacia abajo para el desarrollo del flagelo, donde sus porciones migran hacia la cola y comienzan a desaparecer mientras que algunas porciones forman la capa postnuclear (Senger 2003).
- **Fase de maduración:** Las mitocondrias forman un espiral alrededor de la pieza media del flagelo. La capa postnuclear es formada de los microtúbulos machete. El anillo forma la coyuntura entre la pieza media y la pieza principal. Finalmente se da la completa diferenciación del espermatozoide, el cual se cubre de una membrana plasmática, la cual es importante para la sobrevivencia y función de este. (Senger 2003).

Cuando finaliza la espermiogénesis, las histonas de los núcleos haploides son eventualmente reemplazadas por protaminas; dicho reemplazamiento resulta en el completo paro de transcripción en el núcleo y facilita que este último asuma una estructura casi cristalina (Govin *et al.* 2004). El esperma resultante entra al lumen del tubo seminífero.

3. Esteroidogénesis del testículo

El eje Hipotálamo-Pituitaria-Testículo (HPT) es un ejemplo clásico de un circuito de regulación endocrina. El nivel más alto es el hipotálamo, donde se sintetiza un decapeptido, conocido como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual es el estímulo positivo para la secreción de gonadotropinas de la pituitaria anterior. Los axones terminales de las neuronas GnRH positivas hacen contacto en la eminencia media con los vasos porta hipofisarios, los cuales transportan la hormona liberadora, secretada en pulsos de intervalos de 1-2 horas a la pituitaria anterior. En la pituitaria, GnRH estimula la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Los picos secretorios son distintos entre estas hormonas, debido a que la vida media circulatoria de LH es más corta que FSH. El objetivo de la acción de LH en el testículo son las células de Leydig intersticiales, mientras que FSH actúa sobre las células de Sertoli en el túbulo seminífero. LH actúa en las células de Leydig para la síntesis de testosterona, hormona responsable del mantenimiento de la espermatogénesis y para los efectos de andrógenos extra gonadales. FSH en principio mantiene la capacidad funcional de las células de Sertoli en apoyo de la espermatogénesis ya que las células de Sertoli son dependientes de FSH, y transforman testosterona a estradiol. Ambas, FSH y testosterona ejercen su acción sobre las células germinales, pero la testosterona tiene una acción específica sobre las etapas tardías de la maduración de las espermátidas; mientras que FSH por su capacidad de estimular la mitosis de las células de Sertoli durante el desarrollo testicular, pueden influir en la capacidad espermatogénica de los testículos adultos (Senger 2003).

La otra parte del eje HPT es la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales y hormonas peptídicas a niveles hipotálamo-pituitaria, para mantener el balance funcional de la regulación (Evans *et al*, 1996). Aquí la testosterona, al menos en parte después de la conversión a estradiol, suprime la secreción de GnRH a nivel hipotalámico y síntesis de gonadotropinas en la pituitaria, sin embargo, los esteroides testiculares tienen efecto sobre FSH, la regulación específica de esta hormona toma lugar a nivel de la pituitaria a través de dos proteínas características de las células de Sertoli, activina e inhibina (Wang C. 1999).

Antes de que el espermatozoide sea producido, se necesitan de ciertos requerimientos endocrinos:

- Adecuada secreción de GnRH del hipotálamo
- Secreción de FSH y LH del lóbulo anterior de la pituitaria
- Secreción de esteroides gonadales (testosterona y estrógeno) (Senger 2003).

4. CICLO DEL EPITELIO SEMINÍFERO

El ciclo del epitelio seminífero de animales sexualmente maduros está compuesto de, adicionando a las células de Sertoli, una o dos generaciones de espermatogonias vistas a lo largo de la membrana basal, una o dos generaciones de espermátocitos, y una o dos generaciones de espermátidas limitando el lumen del túbulo. Una “generación” está definida como un grupo de células que se encuentran aproximadamente en la misma etapa de desarrollo. Por lo tanto, representa un grupo de células producidas al mismo tiempo y que evolucionan sincrónicamente a través del proceso espermatogénico. Las diferentes generaciones de células germinales forman asociaciones celulares de composición fija. Por ejemplo, las espermátidas en una etapa dada de la espermiogénesis siempre están asociadas con los mismos tipos de espermatogonias y espermátocitos. Solo un número limitado de tales asociaciones pueden ser observadas en varias secciones transversales del túbulo seminífero (Leblond and Y. Clermont, 1952).

El análisis de la composición de las diversas asociaciones celulares pronto revela que, en un área dada de un túbulo seminífero, ellas pueden aparecer en una secuencia dada y fija. Dado que dicha secuencia debe repetirse indefinidamente, el epitelio seminífero es un conjunto que evoluciona en una manera cíclica y puede tomarse una serie completa de las asociaciones celulares para constituir “un ciclo del epitelio seminífero” (Leblond and Y. Clermont, 1952).

Las típicas asociaciones celulares están referidas a las etapas del ciclo. Tales etapas representan subdivisiones artificiales a través de un proceso continuo y por lo tanto la demarcación entre el final de una etapa y el comienzo de la siguiente es a menudo imprecisa. Para una especie animal dada, el número de asociaciones celulares o etapas del ciclo pueden variar dependiendo el criterio usado para caracterizarlas o identificarlas. Tales criterios son arbitrarios y varían considerablemente de un investigador a otro, existiendo dos tendencias distintas en la elección de los criterios para la identificación de las etapas. El primer método utiliza la morfología nuclear de las espermátidas simultáneamente con la posición de las espermátidas más maduras dentro del epitelio seminífero al igual que el arreglo de todo el epitelio germinal dentro del túbulo seminífero. El segundo método utiliza las etapas de desarrollo de las espermátidas (Leblond and Y. Clermont, 1952).

5. Genes involucrados en la morfogénesis testicular

VASA

Es un gen conocido en mamíferos cuya expresión es específica del linaje germinal. La conservación evolutiva del gen *Vasa* está específicamente expresada en el linaje germinal en vertebrados e invertebrados (Raz, 2000). El gen *vasa* codifica una RNA helicasa dependiente de ATP de la familia de proteínas con la caja DEAD (Lasko and Ashburner, 1998; Hay *et al.*, 1990; Toyooka T. 2000). *Vasa* está presente en el ovocito en desarrollo y es parte del plasma germinal. El gen *Vasa* en humanos se expresa durante la espermatogénesis normal en espermatogonias, incrementando sus niveles en espermatocitos y espermatidas, regulándose negativamente en los espermatozoides (Castrillon *et al.* 2000; Zeeman A. 2002).

En ratón, la proteína de MVH (mouse vasa homolog) se ha observado restringida exclusivamente a las CGPs durante la embriogénesis y gametogénesis en ambos sexos. La proteína MHV parece estar exclusivamente localizada en el citoplasma de estas células espermatogénicas y alguna tinción granular fue observada en espermatocitos en paquiteno y espermatidas redondas (Toyooka T. 2000).

Sox9

Sox9 (Gen con región HMG relacionado con *Sry*) codifica para un factor de transcripción que contiene la caja HMG, motivo de unión a ADN (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993), y es uno de los principales genes autosómicos relacionados con la diferenciación sexual que se encuentra conservado en vertebrados (Kent *et al.*, 1996; Jakob S. and Lovell-Badge R. 2011). Se expresa en las células de Sertoli y ha sido empleado como marcador de diferenciación testicular en diferentes especies de vertebrados (Morais da Silva *et al.*, 1996; Cameron y Sinclair, 1997)

Es claro que altos niveles de *SOX9* son requeridos para el desarrollo testicular por lo que puede ser considerado como un gen determinante testicular que actúa río abajo de *SRY*. En el ratón, los transcritos de *Sox9* se detectan en la cresta urogenital de ambos sexos y posteriormente es regulado negativamente en el ovario y se mantienen en el testículo hasta la vida adulta (Kent *et al.*, 1996; Morais da Silva *et al.*, 1996). Se ha demostrado que la interacción directa de *SF-1* (factor esteroideogénico-1) y *SOX9* se requiere para la activación de la transcripción de la hormona anti-mülleriana (AMH) esencial en la regresión de los conductos de Müller durante la diferenciación testicular (de Santa Bárbara *et al.*, 1998; Arango *et al.*, 1999).

Phospho-Histone 3

EL DNA eucariotico está asociado con histonas y otras proteínas, formando una estructura estable pero dinámica llamada cromatina. Las histonas están entre las proteínas más altamente conservadas evolutivamente y construyen octámeros con aproximadamente 147 pares de bases de DNA genómico formando la unidad básica de la cromatina, el nucleosoma (Wells D. and McBride C.1989; Luger K. 1997). Las histonas contienen un dominio globular con un característico plegamiento que media la interacción entre las histonas dentro del nucleosoma, así como una cola N-terminal flexible. Las colas N-terminal, así como los dominios globulares están sujetos a una gran variedad de modificaciones post-traduccionales covalentes reversibles (PTMs), tales como acetilación, metilación, fosforilación y ADP-ribosilación.

La fosforilación de la histona 3 es menor en células en interfase y ocurre casi exclusivamente durante la mitosis. En células de mamífero ha sido demostrada la fosforilación sitio específica de H3 en la serina 10 (ser 10), iniciando en la profase, siendo máxima durante la metafase, disminuyendo durante la anafase y se pierde durante la telofase (Gurley et al. 1978; Paulson and Taylor 1982; Hendzel M. et al.1997; Sawicka A. 2012).

Se propone que la fosforilación del amino terminal de la histona 3 puede estar relacionada en la facilitación de dos tipos de funciones durante la mitosis:

- 1.-Regular las interacciones de proteínas para promover la unión de factores que dirigen la condensación de la cromatina en células que entran en fase M.
- 2.- Coordinar la descondensación de la cromatina asociada con la fase M (Hendzel M. et al.1997)

La fosforilación de H3 en células mitóticas de mamíferos ocurre masivamente en varios residuos, incluyendo serina 10 y 28, así como treoninas 3 y 11 exhibiendo una distribución espacio-temporal altamente coordinada (Bonenfant D. 2007; Garcia B. 2005; Zhou H. 2008).

C-KIT

C-kit es un proto-oncogen que codifica para un receptor tirosina cinasa (transmembranal) miembro de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) de la familia de receptores del factor estimulante de colonias (CSF-1) (Yarden *et al.* 1987; Qiu *et al.* 1988; Yoshinaga K. 1991). En el ratón se ha observado que C-kit se expresa predominantemente en células germinales del testículo (Manova et al., 1990), siendo esencial durante su migración hacia las gónadas en diferenciación, así como en su proliferación y supervivencia (Manova *et al.*, 1990; Godin *et al.*, 1991; Pesce *et al.*, 1993; Robinson L. 2001).

Estudios recientes donde se ha empleado hibridación in situ (HIS) demostraron que el RNA mensajero de c-kit se detecta no solo en las células germinales primordiales de gónadas fetales (Orr-Urtreger *et al.* 1990), sino también en ovocitos y espermatogonias de ovarios y testículos respectivamente (Manova *et al.* 1990). Se sugiere que este factor puede funcionar en la gametogénesis, no solo durante la embriogénesis temprana sino también en el desarrollo postnatal; sin embargo la expresión no necesariamente indica su estatus funcional. En suma, c-kit y su ligando steel (factor stem cell) se expresan en una gran variedad de células, tejidos y órganos (Nocka *et al.* 1989; Manova *et al.* 1990; Orr-Urtreger *et al.* 1990).

Estudios en roedores han demostrado que el receptor proto-oncogen, c-kit, y su ligando, el ligando steel están involucrados en la migración de las células germinales del saco vitelino hacia las gónadas y su subsecuente sobrevivencia y desarrollo (Manova *et al.*, 1990; Godin *et al.*, 1991; Pesce *et al.*, 1993; Robinson L. *et al.* 2001). La presencia de un receptor funcional ha sido implicado en la proliferación de espermatogonial, sobrevivencia y adhesión a células de Sertoli (Loveland and Schlatt, 1997).

6. REPRODUCCIÓN EN MURCIÉLAGOS

Además de los aspectos anatómicos y fisiológicos, el éxito reproductivo de los murciélagos depende de su organización social, que les permite identificarse como individuos y promueve la proximidad de hembras y machos maduros durante la época de apareamiento. Los murciélagos pueden formar colonias mixtas o bien segregarse por sexos. Para la integración de las parejas se deben considerar varios aspectos. El reconocimiento sexual entre murciélagos se logra a través de los caracteres sexuales primarios, de modo que la función de la organización social es aparentemente la expresión de los caracteres sexuales secundarios y el comportamiento sexual se favorece mediante signos visuales, táctiles, acústicos y olfatorios. Ciertas especies de murciélagos presentan dimorfismo sexual, por lo cual los machos pueden ser más grandes que las hembras o viceversa o haber variaciones en la intensidad de la coloración del pelaje (Crichton E. and Krutzsch. P. 2000).

Existen diferencias en relación a la ubicación de los testículos en murciélagos. Pueden ser permanentemente abdominales, inguinales (cuando hay un escroto presente), escrotales, migratorios (migran del abdomen al escroto vía canal inguinal) y externos (dentro de un sáculo no pigmentado cubierto de piel altamente vascularizada donde los vasos se congestionan durante la época de reproducción, no es un verdadero escroto). Los testículos llevan los espermatozoides al epidídimo y los ductos deferentes para posteriormente ser transportados a las glándulas ampulares y a continuación al lumen de la uretra prostática. La cola del epidídimo puede almacenar espermatozoides por periodos de semanas a meses, principalmente en clima templado en especies hibernando; sin embargo, algunas especies tropicales del hemisferio sur hacen lo mismo. En relación al

órgano copulador (pene) existe variación taxonómica en su postura, que puede estar dirigida en sentido caudal o craneal. Sin embargo, la arquitectura morfológica básica es esencialmente la misma para todas las especies (Crichton E. Krutzsch. P. 2000). En la familia *Phyllostomidae* el baculum es ausente (Brown *et al.*, 1971).

En algunas especies de murciélagos de la Familia *Phyllostomidae* hay una consistencia en la disposición de las glándulas sexuales accesorias; glándulas ampulares, glándulas vesiculares, próstatas y glándulas bulbouretrales están presentes.

Los espermatozoides de los quirópteros son clásicamente de mamíferos con distinciones inter-familia. Un trabajo realizado por Forman y Genoways en 1979 caracterizó la morfología del espermatozoide usando microscopia de luz de 35 especies de filostómidos, donde se observó que existen delicadas variaciones entre especies, principalmente en el acrosoma y la morfología de la cabeza.

7. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

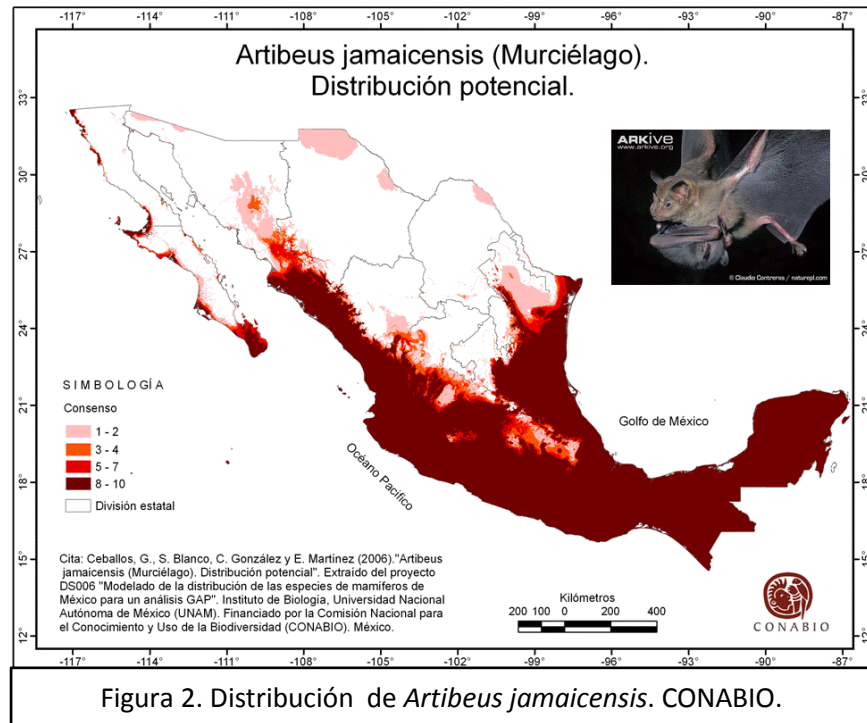
Artibeus jamaicensis es un murciélago que pertenece al orden Chiroptera, suborden Microchiroptera y familia Phyllostomidae (Baker R. *et al.* 1967). *Artibeus jamaicensis* se caracteriza porque presenta su arco zigomático completo, ausencia de cola y una estrecha membrana interfemorale (Jones J. and Carter J. 1976). Pesa de 45 a 50 g y tiene una altura total entre 78-89 mm, 20-27mm de largo de las orejas, 52-67.4 de largo de antebrazo, 8.6-9.0 de lanceta, 26.2-31.6 de cráneo, cóndilo basal 27.8-30mm. La máxima longevidad de esta especie es de 9 años en vida salvaje (Gardner A. *et al.* 1991).

Dentro de los quirópteros, *A. jamaicensis* es de tamaño mediano (longitud de la cabeza y cuerpo de 65 a 85 mm; longitud del antebrazo de 50 a 64 mm); posee un dorso gris pálido a gris oscuro y vientre pálido; con dos líneas faciales blanquecinas; rostro corto, moderadamente ancho; hoja nasal triangular y gruesa; ojos pequeños; se distingue de *A. intermedius* y *A. lituratus* porque el uropatagio tiene pelo muy corto y aparenta estar desnudo, además de ser de tamaño más pequeño. (Romero M. 2005). Esta especie no está en la lista de conservación y muchos reportes lo consideran abundante en hábitats perturbados y sin molestias a lo largo de su distribución.

DISTRIBUCIÓN, HÁBITAT Y ALIMENTACIÓN

Tiene una amplia distribución, desde Sinaloa hacia el sur de México, Ecuador, Venezuela, Trinidad y Tobago, las Antillas, Florida, Brasil hasta el norte de Argentina (Mares M. *et al.* 1981; Myers P. and Wetzel M. 1983; Redford and Eisenberg 1992) (Figura 2). Es encontrado en hábitats tropicales, tales como bosque tropical perenne e incluso penetra en bosques nublados y en hábitats secos tropicales, tales como el bosque seco estacional

y hábitats modificados por el ser humano (Einsenberg, 1989; Morrison, 1979). Utiliza cuevas, arboles huecos, follaje denso, edificios, casas de campaña y gallineros (Tim, 1987; Morrison and Handley, 1991; Kunz and McCracken, 1995). La especie es principalmente frugívora mostrando una fuerte preferencia por los higos (Figura 3). Las partes de la planta que come son: fruto entero, solo la cascara, solo la pulpa; flores, polen, o néctar y hojas. (Grenhall, 1956; Gadner, 1977; Handley *et al.* 1991; Kunz and Díaz, 1995) (Figura 2).



FISIOLOGÍA

A. jamaicensis tiene una temperatura corporal de 38.7°C, es intolerante a temperaturas inferiores a los 10°C y temperaturas superiores a 41.5°C son letales (Morrison P. and McNab K. 1967); su capacidad termorreguladora es variable, ya que la temperatura de su cuerpo depende del ambiente, manteniendo una diferencia entre 8.3°C y 6.6°C (Studier E. and Wilson D. 1979).

REPRODUCCIÓN

HEMBRAS

El sistema reproductor de las hembras, presenta un útero simple tubular con una terminación fúndica cubierta por los oviductos. Internamente, el útero tiene un lumen sin cornua uterina intramural (Hood S. y Smith D. 1983). Las hembras tienen dos periodos de estro postparto anualmente y producen una sola cría, o raramente gemelos en cada parto. La reproducción ocurre al final de la temporada de lluvias y el parto ocurre en secas (Barlow J. and Tamsitt J. 1968).

En la segunda temporada de crianza, las hembras pueden mostrar un retraso en el desarrollo embrionario (2.5 meses) y su cría nace en la siguiente temporada (Fleming T. 1971). En México se han encontrado todo el año en temporada de reproducción; muchas hembras han sido capturadas con embriones, o lactando en diferentes partes del año (Hall E. and Dalquest W. 1963; Jones J. *et al.* 1972, 1973).

La maduración sexual es alcanzada en 8 meses por hembras y 12 meses por machos (McManus y Nelis, 1972; Keast y Handley, 1991).

MACHOS

Con respecto a los machos, la talla de los testículos de un adulto está relacionada con la espermatogénesis y los testículos llegan a ser grandes durante el estro postparto de las hembras (Fleming T. *et al.* 1972) y muestran un desgaste de los dientes caninos a comparación de los machos solteros (Kunz *et al.* 1983). La longitud de los testículos en adultos es de 3.5-10 mm (Forman y Genoways, 1979) y la primera copulación ocurre hasta los 2 días postparto (Figura 4).

Las características de los filostómidos es la ausencia de baculum (Brown *et al.*, 1971). El pene ha sido descrito en *Macrotus californianus* (Crichton E. Krutzsch *et al.*, 1976). Este es altamente pigmentado con escaso pelo y un tanto inflexible (como resultado de la presencia de una túnica de colágeno gruesa que envuelve el cuerpo del pene). La longitud del pene es de 7.0 mm (6.5-7.5 mm, n=30), 20% del cual es ocupado por las glándulas (Crichton E. Krutzsch P. 2000).



Figura 4. Fotografía del murciélago zapotero *A. jamaicensis*. A. Macho. B. Hembra. Tomada de

ANTECEDENTES

En trabajos anteriores se ha realizado la descripción del testículo en murciélago, así como de la espermatogénesis. Moreno M. *et al.* (2009) en su trabajo basado en la migración y diferenciación de las células germinales en *Sturnira lilium* y *Artibeus jamaicensis*, habla de la diferenciación testicular durante el desarrollo embrionario, detectando en *A. jamaicensis* siete etapas. Oliveira y colaboradores (2009) trabajaron con *Artibeus lituratus* manejando dos tallas diferentes de testículos relacionándolas con los periodos de actividad y regresión espermatogénica en dicha especie, basadas en técnicas histológicas; haciendo hincapié en la caracterización de las etapas del ciclo del epitelio seminífero, encontrando las ocho etapas establecidas de acuerdo a la morfología tubular (Berndtson 1977). Duarte y Talamoni en el 2009, investigaron la actividad testicular de los machos y la condición reproductiva de las hembras en relación a sus características reproductivas externas (gestación, lactancia, post-lactancia) en el murciélago filostómico *Artibeus lituratus*, examinando 526 individuos (197 machos y 329 hembras) en el periodo de Diciembre del 2001 a Mayo del 2003. Estos autores mencionan que la actividad reproductiva de los machos puede estar relacionada a periodos de receptividad de las hembras. Beguelini *et al.* 2009, en su trabajo titulado “Morphological characterization of the testicular cells and seminiferous epithelium cycle in six species of neotropical bats” caracterizaron el proceso espermatogénico en diferentes especies de la familia Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium*) y una especie de la familia Vespertilionidae (*Myotis nigricans*) por diferentes técnicas histológicas. El ciclo del epitelio seminífero de las cinco especies filostómicas fue similar a otros mamíferos, mostrando etapas graduales por el método de morfología tubular, mientras que en *Myotis nigricans* se observó una asincronía en el ciclo, mostrando superposición de etapas y ciclos indefinidos. La similitud observada en las cinco especies de la familia Phyllostomidae parece estar relacionada a las relaciones filogenéticas, mientras las diferencias en *Myotis Nigricans* se debe a la distancia filogenética que existe con la familia Vespertilionidae. Begueleni Mateus *et al.* (2011) en su trabajo realizado con el murciélago *Platyrrhinus lineatus* sobre la ultraestructura de la espermatogénesis, caracterizaron todos los tipos celulares implicados en dicho proceso mediante microscopía electrónica de transmisión, afirmando que el proceso espermatogénico sigue el patrón de los mamíferos con algunas particularidades, como el proceso de formación del acrosoma y la presencia del perforatorium.

JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta que la mayoría de los hallazgos relacionados con la biología del tracto reproductor de los mamíferos, se han descrito principalmente en roedores, primates y animales domésticos, resulta interesante considerar estos aspectos en animales de fauna silvestre. A este respecto, muestra especial interés las características reproductivas de los murciélagos, en particular las especies de la familia *Phyllostomidae*, quienes presentan algunas similitudes con la reproducción humana y algunos primates, este es un aspecto importante para considerar a dichos ejemplares como especies de laboratorio. Hasta el momento no se ha realizado un trabajo en *Artibeus jamaicensis* que conlleve un estudio continuo a lo largo del año de la caracterización del testículo por medio de diferentes técnicas histológicas, que será de gran utilidad para conocer la madurez sexual y estacionalidad reproductiva de estos organismos así como la relación que existe entre la actividad reproductiva de los machos con respecto a las condiciones de las hembras, que en un futuro podrán ser de gran ayuda en la conservación de dicha especie en un periodo de contingencia, ya que se podrá establecer en qué momento se pueden coleccionar estos individuos o cual es el periodo de mayor cuidado de dicha especie. Además de que los estudios que se han hecho en esta especie y miembros de la familia *Phyllostomidae* se han realizado en Sudamérica, sin encontrarse descripciones de esta especie en México y mucho menos de sus características reproductivas.

HIPOTESIS

A pesar de que se menciona que *Artibeus jamaicensis* tiene reproducción continua; la morfología testicular variará de acuerdo a la estación del año y la localidad en la que los organismos sean colectados.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la morfología y el patrón de expresión de genes característicos del testículo de los mamíferos en el murciélago *A. jamaicensis* en las cuatro estaciones del año.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar los aspectos macroscópicos de los machos de *Artibeus jamaicensis* (Peso del organismo, longitud total, longitud del brazo, longitud del antebrazo y diámetro escrotal).
- Describir la estructura y ultraestructura del testículo de *Artibeus jamaicensis*
- Establecer las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero
- Determinar histológicamente la expresión de los genes: *Vasa*, *C-kit*, *Phospho-H3* y *Sox9* del testículo de *Artibeus jamaicensis* a lo largo del año.
- Analizar los niveles de expresión del mRNA y de la proteína *Vasa*, *C-kit*, *Phospho-H3* y *Sox9* en los testículos de *Artibeus jamaicensis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Colecta de los individuos

Los Machos adultos de la especie *Artibeus jamaicensis* se capturaron con redes tipo niebla a las orillas del río y cerca de árboles frutales, en el poblado de Yautepec, Morelos (Permiso SGPA/DGVS/007901/13). Los individuos fueron identificados por medio de claves taxonómicas de Medellín y colaboradores (2008) y fueron trasladados al laboratorio en sacos de manta con fruta en condiciones de oscuridad (Figura 5).

2. Obtención de muestras

En el laboratorio, cada organismo se sacrificó con 20 unidades de pentobarbital sódico (Sedalphorte) administrado vía intraperitoneal.

Para la evaluación macroscópica, a los machos se les tomó el peso por medio de una balanza analítica (SETRA). La longitud total, longitud del antebrazo, longitud del brazo, diámetro escrotal y la longitud del testículo se determinaron por medio de un vernier. Posteriormente, se llevó a cabo una cirugía en la cual se hizo una pequeña incisión en la parte posterior dorsal para obtener ambos testículos de cada individuo. Estos se colocaron en un amortiguador salino de fosfatos (PBS, Phosphate-buffered saline, pH 7.1, Gibco) donde se retiró la túnica albugínea para una mejor penetración del fijador.

Los procedimientos de realizaron de acuerdo con la Guía de Uso de Animales del Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Figura 5).

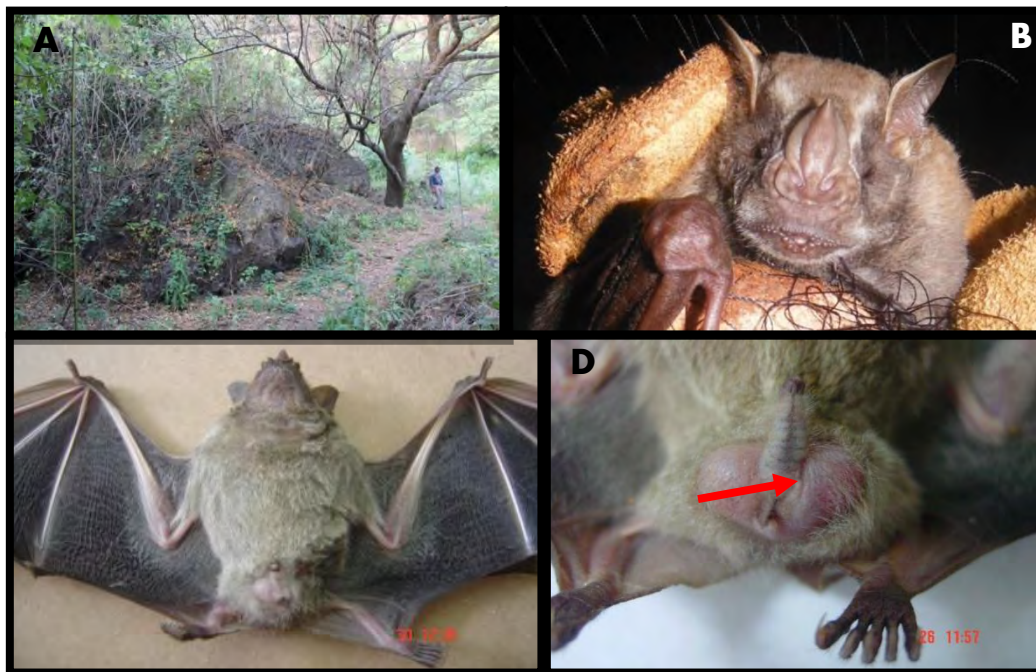


Figura 5. A. Lugar de colecta de los individuos en el poblado de Yautepec, Morelos. B. Individuo de la especie *Artibeus jamaicensis* retirado de la red. C. Vista dorsal del individuo anestesiado. D. Acercamiento de la zona de incisión (flecha).

3. Microscopía de campo claro y electrónica

Para el análisis morfológico del testículo se empleó la técnica convencional de microscopía de luz de alta resolución. Los testículos se fijaron en una solución de Karnovsky (Paraformaldehído 1%-Glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4) (Karnovsky, 1965) durante 12 horas a 4°C; se lavaron con amortiguador de cacodilatos (pH 7.3, 0.1M) y se posfijaron con tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% en amortiguador de Zetterqvist por 1 hora. El tejido se deshidrató en una serie de alcoholes graduales de manera creciente (70 al 100%). Posteriormente se colocaron en acetonitrilo por 40 minutos seguido de una mezcla de acetonitrilo-epón (1:1) por una hora, acetonitrilo-epón (1:2) por una hora y finalmente se dejaron en epón puro toda la noche en rotación. Los testículos se incluyeron en la resina de epón 812 y se polimerizaron a 60°C durante toda la noche. Se realizaron cortes semifinos en un ultramicrotomo (LKB, USA), los cuales se tiñeron con azul de toluidina al 5% y se montaron en un medio (Cytosil). Dichos cortes de 1 µm se observaron por medio de microscopía de luz y confocal para la determinación de las etapas del ciclo del epitelio seminífero de acuerdo a el sistema acrosómico (Leblond and Y. Clermont, 1952 / Berndston, W. 1977). También se realizaron cortes finos (70-90 nm) que se contrastaron con acetato de uranilo al 25% y citrato de plomo al 0.3% para su observación al microscopio electrónico de transmisión (JEOL-JEM-1010).

4. Inmunofluorescencia

Para la detección de las proteínas Vasa, Sox9, H3 y C-kit se empleó la técnica de inmunofluorescencia. Para ello, los testículos disectados fueron fijados en paraformaldehído al 4% 20 minutos, se colocaron en sacarosa al 30% toda la noche y se incluyeron en un medio de montaje (Tissue Teck) y congelaron a -70°C. Se realizaron cortes de 20 micras en frío por medio de un criostato (Leica). Una vez obtenidas las secciones, se colocaron en una cámara húmeda y se trataron con Tritón al 1% en PBS durante 10 minutos y se incubaron con albúmina al 1% en PBS durante 2 horas. Las secciones se incubaron con el anticuerpo contra las proteínas Vasa, Sox9, H3 y C-kit (tabla 1) durante toda la noche a 4°C. Después de cuatro lavados con PBS de 5 min, se bloquearon con albúmina por 15 min, para posteriormente ser incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a un fluorocromo (Tabla 2) por 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente con PBS (4 lavados) y se montaron en una solución acuosa Dako.

También se realizaron inmunofluorescencias dobles siguiendo la misma técnica arriba descrita, pero añadiendo una fijación con paraformaldehído al 4% después de concluida la detección del primer anticuerpo. Después de lavar con PBS, se realiza la misma técnica con el siguiente anticuerpo. Se realizaron controles negativos, en los que se llevó acabo la misma técnica de inmunofluorescencia pero sin el anticuerpo primario.

Tabla 1. Relación de los anticuerpos primarios utilizados en el trabajo

Anticuerpo primario	Especie	Marca/Catálogo	Dilución
Alfa Sox9	Conejo	Donación Dr. Merchant	1:100
Vasa DDX4	conejo	Abcam (ab 13840-100)	1:250
Anti phospho-Histone H3	conejo	Upstate (06-570)	1:200
C-kit	Conejo	Santa Cruz (sc-168)	1:200

Tabla 2. Relación de los anticuerpos secundarios utilizados en el trabajo

Anticuerpo secundario	Origen	Marca/Catálogo	Dilución
Anti-conejo IgG Rodamina conjugado	conejo	Zymed (81-67)	1:100
Anti-conejo CY5	conejo	Invitrogen (A10523)	1:100
Anticonejo CY3	conejo	Invitrogen(A10520)	1:100
Anti-conejo Fluoresceinado (FITC)	conejo	Zymed (81-6111)	1:100

Posteriormente las inmunofluorescencias se observaron al microscopio confocal (LSM 5 Pascal, Carl Zeiss) equipado con un láser de Argón-Kriptón Y Helio-Neón y se tomaron fotografías en un formato de archivo LSM para su análisis.

5. Biología molecular

a) Western blot

Para corroborar la presencia de las proteínas analizadas (Vasa, Sox9, H3 y Ckit) se empleó la técnica de western blot. Los testículos congelados a -70°C se trataron de la siguiente manera:

1. Extracción de proteínas: La muestra se descongeló y agregó buffer de lisis (dos veces el volumen de acuerdo a su peso). Se homogeneizó el tejido muy despacio evitando la presencia de burbujas. Se colocó a 4°C en agitación por una hora.
2. Cuantificación de proteínas: Se cuantificó la muestra de proteínas en un espectrofotómetro (Eppendorf) colocando un blanco ($1\ \mu\text{l}$ de buffer de lisis en $99\ \mu\text{l}$ de agua destilada) y la muestra en una dilución 1:100 ($1\ \mu\text{l}$ de muestra en $99\ \mu\text{l}$ de agua destilada). Se midió la absorbancia y calculó la concentración por medio de una curva de BSA (bovine serum albumin).
3. Corrimiento de gel: Se prepararon geles de poliacrilamida, primero un gel inferior de diferentes concentraciones de acuerdo al peso de la proteína (10 % y 12%) y un gel superior donde se colocan los peines formadores de pozos. A la muestra se le agrega Sample Buffer 2X (Rosenstain) en proporción 1:1. Se coloca en el primer carril $5\ \mu\text{l}$ de marcador de proteínas y en los siguientes carriles cada una de las muestras, se corre en buffer de corrida a 20 miliampers por una hora, en frío.
4. Transferencia: El gel de proteínas se colocó frente a una membrana de transferencia (nitrocelulosa), entre ellos se coloca papel wattman y esponjas cuidando que no queden burbujas en dichos espacios. Se colocan en la cámara de transferencia y corren a 400 mA por una hora en buffer de transferencia. Posteriormente se tiñe la membrana con rojo de Ponceau para revisar si las proteínas se transfirieron correctamente y se corta la membrana correspondiendo a cada carril. Después se lavó con agua destilada y finalmente cada carril se colocó por separado en TBS 1X.
5. Bloqueo: Para el bloqueo de uniones inespecíficas se utilizó leche en polvo al 5% en TBST 1X. Se colocó 1mL a cada membrana y se deja agitando por una hora.
6. Incubación de los anticuerpos: Se colocan los anticuerpos primarios con sus respectivas diluciones (Sox9 1:500, Vasa, C.kit y pH31:1000) en leche al 5% TBST y se incubó toda la noche a 4°C . Posteriormente se deja incubar a temperatura ambiente en movimiento por una hora y se realizan tres lavados de 5min con TBST 1X. Se colocó el anticuerpo secundario IgG hecho en la especie en cuestión en una dilución 1:3000 en leche al 5%, por una hora en movimiento.

Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBST 1X.

7. Revelado: A las membranas se les coloca el sustrato para el anticuerpo secundario por un minuto. Posteriormente las membranas se colocan entre los plásticos y se ponen en contacto con el film, se realizaron varios tiempos de exposición. El film se pasa al revelador por 30s, se enjuaga con agua, pasa al fijador 30s, se lava y se escurre para ser analizado.

Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Con la finalidad de estudiar la expresión de los genes Sox9, Vasa y C-kit se llevó a cabo la técnica de RT-PCR de dos pasos. Debido a que las secuencias de dichos genes en *Artibeus jamaicensis* no se encuentran disponibles en la base de datos del Gen Bank, no fue posible diseñar oligonucleótidos para esta especie, por lo que se seleccionaron los oligonucleótidos reportados en ratón (*Mus musculus*). Como control positivo se realizó la amplificación del fragmento del gen β -actina.

- Extracción de RNA total

Se obtuvieron los testículos de ejemplares adultos de *Artibeus jamaicensis* y de ratones adultos de la cepa CD1, los cuales se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron en un ultracongelador a -70°C . Para la extracción de RNA total se empleó el método de Trizol/Cloroformo (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA).

La extracción consistió en cinco fases:

1. Homogeneización: el tejido se homogeneizó al agregarle 500 μl de Trizol hasta que se desintegro en su totalidad, se completa un volumen de 1mL y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Separación: Se adicionaron 200 μl de cloroformo (J.T.Baker), se mezcló por inversión e incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 minutos a 14000 rpm a 4°C .
3. Precipitación: La fase transparente se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 1 μl de glicógeno y 500 μl de isopropanol agitándose hasta que se incorporaran ambas fases. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavado de RNAt: Para obtener la pastilla de RNAt y remover el sobrenadante, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C . Posteriormente la pastilla se lavó con 200 μl de etanol al 75% en agua DEPC (libre de RNAsas) y se centrifugó nuevamente 5 minutos a 10,000 rpm. El botón se secó a temperatura ambiente por 10 minutos.
5. Resuspensión del RNAt: El botón se resuspendió en 50 μl de agua DEPC (Dietilpirocarbonato) y se guardó a -70°C .

Posteriormente se cuantificó el RNAt extraído del tejido. Se realizó una dilución 1:100 (1 μl de RNAt en 99 μl de agua DEPC). Se realizaron lecturas de absorbancia a 260 y a 280 nanómetros (nm) para obtener la concentración y pureza.

Para determinar la calidad del RNAt de las muestras analizadas se realizó una prueba de integridad, para lo cual se corrió 1 µl de RNAt con 4 µl de buffer de carga en un gel de agarosa (Gibco) al 1%.

- Síntesis de cDNA

Después de la cuantificación del RNA total se trató con DNAsa 1 (Invitrogen) para la síntesis de cDNA la cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Al RNA tratado con DNAsa se le agregó oligo dT, deoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), agua DEPC y se incubaron a 65°C por cinco minutos.
2. Posteriormente se agregó un buffer para la enzima transcriptasa reversa (RT 5X), un estabilizador de la enzima (Dithiothreitol DTT), RNAsa out (Invitrogen) y se incubó con la enzima transcriptasa reversa a 37°C por una hora.
3. Se inactiva la enzima incubando a 70°C durante 15 minutos

- PCR

Teniendo el cDNA se llevó a cabo la técnica de PCR para la amplificación de las secuencias de los genes en cuestión. Al cDNA se le agregó un buffer de magnesio (10X PCR buffer Mg), cloruro de magnesio como un cofactor, dNTPs, oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido), enzima Taq polimerasa y el volumen se completó con agua libre de RNAsas (DEPC). La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf.

Finalmente a cada tubo con los productos del PCR se les agregaron 4 µl de buffer de carga y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% TAE 1X, 10 µl de la muestra a 110 V.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes Sox9, Vasa, C-kit y β –actina.

Gen	Oligonucleótidos	Fragmento de PCR
Sox9	1: 5´AAGAAAGACCACCCCGATTACA 3´ 2: 5´CAGGGCCTTGAAGATAGCATT 3´	126 pb
Vasa	1: 5´GCTCAAACAGGGTCTGGGAAG 3´ 2: 5´GGTTGATCAGTTCTCGAG 3´	145 pb
C-kit	1: 5´CACGCGCCTGCCGAAATG 3´ 2: 5´CTGCTGCCACCGAGTTGACC 3´	212 pb
β -actina	1: 5´GGGTCAGAAGAATTCCTATG 3´ 2: 5´GGTCTCAAACATGATCTGGG 3´	238 pb

RESULTADOS

I. Características macroscópicas

En cuanto al número de individuos colectados en cada estación, hubo variaciones debido a las dificultades de colecta, se colectaron más individuos en la estación de otoño y el menor número en primavera.

Con respecto a las medidas macroscópicas que fueron tomadas a todos los individuos colectados se observó un promedio de longitud total de 8.58 cm, longitud de brazo de 3.69 cm, longitud antebrazo de 5.33, peso de 43.71 g y un diámetro escrotal de 1.57 cm.

A continuación se presentan los datos morfológicos de los individuos de *Artibeus jamaicensis*:

Individuo	Colecta	Sacrificio	Longitud total	Peso	Longitud del brazo	Longitud antebrazo	Diámetro escrotal
1	24-09-11	29-09-11	8.57	36.41	2.72	5.55	1.42
2	24-09-11	6-10-11	8.53	44.35	2.81	5.73	1.35
3	24-09-11	20-10-11	8.72	41.02	2.51	5.63	1.3
4	24-10-11	10-11-11	9.13	41.64	2.73	5.65	1.53
5	28-01-12	08-02-12	8.54	40.50	3.72	5.23	1.53
6	11-07-12	23-07-12	8.45	41.65	4.2	5.3	2.4
7	11-07-12	26-07-12	8.25	38.20	2.92	5.43	1.84
8	11-07-12	26-07-12	7.86	38.83	2.85	5.28	1.52
9	6-12-12	10-12-12	8.73	35.59	3.3	5.1	1.2
10	6-12-12	13-12-12	9.4	59.31	6.1	3.8	1.8
11	6-12-12	13-12-12	8.7	57.74	6.2	3.8	1.3
12	08-02-13	11-02-13	9.0	56.22	4.6	6.9	1.5
13	23-05-13	29-05-13	7.7	36.8	3.3	5.9	1.8



II. Estructura del testículo

El testículo de *Artibeus jamaicensis* presentó un epidídimo que lo rodea en gran parte de su extensión conformado por una cabeza, cuerpo y cola. En cuanto a su estructura presenta una túnica albugínea que lo cubre en su totalidad, se puede observar externamente gran cantidad de vasos sanguíneos que envuelven dicho testículo. En promedio mide 0.90 cm de largo y 0.62 cm de ancho.

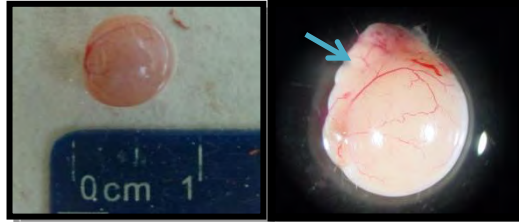


Figura 6. Testículo de *Artibeus jamaicensis*. Se puede observar el epidídimo (flecha) cubriendo la parte lateral del testículo, en el cual se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides.

III. Microscopía de campo claro

El testículo está compuesto de gran cantidad de túbulos seminíferos arreglados en lóbulos que desembocan en la rete testis que lleva consigo los espermatozoides que serán transportados al epidídimo. La unidad funcional del testículo es el túbulo seminífero el cual presentó un epitelio germinal implicado en el proceso de espermatogénesis, también se observaron células de Sertoli importantes en dicho proceso. En el compartimento intersticial se observaron vasos sanguíneos y células de Leydig (Figura 7).

El túbulo seminífero es muy parecido al del resto de los mamíferos. Tiene una lámina basal que está rodeada por células mioideas. Dentro del túbulo se observan las espermatogonias, las cuales son las células precursoras de espermatozoides, hacia el lumen se observan espermatocitos primarios en división (profase), espermátidas iniciando el proceso de espermiogénesis y espermátidas en últimas etapas ya que se observan núcleos elongados, rodeados por el citoplasma de células de Sertoli y finalmente en la luz pueden observarse una gran cantidad de flagelos de espermatozoides que serán transportados a la rete testis. Por lo tanto se puede sugerir que *A. jamaicensis* presenta un tipo de espermatogénesis radial como en todos los mamíferos (Figura 8).

Para el análisis histológico del testículo en las cuatro estaciones del año, se realizaron secciones transversales de 1 micra teñidas con azul de toluidina:

Otoño: Se observan gran cantidad de túbulos seminíferos sin luz que tienen una apariencia diferente, ya que se presentan las células germinales mezcladas en toda el área tubular. Los tipos celulares reconocibles son Sertoli, espermatogonias, espermatocitos, espermatidas redondas y elongadas con ausencia de espermatozoides. Se observan túbulos seminíferos con luz en menor cantidad, presentando el arreglo original del túbulo seminífero con espermatogonias en la base y espermatozoides en el lumen. Se puede inferir que hay una menor producción de espermatozoides. En el compartimento intersticial se observan vasos sanguíneos y células de Leydig (Figura 9).

Invierno, primavera y verano: Se observan gran cantidad de túbulos seminíferos con luz y gran producción de espermatozoides. En todos los túbulos presentes se observa el epitelio germinal completo con espermatogonias, espermatocitos primarios en profase, espermatidas redondas en primeras etapas de espermiogénesis y elongadas en últimas etapas. También se pueden observar perfectamente las proyecciones citoplásmicas de las células de Sertoli envolviendo las espermatidas elongadas (Figura 10).

Figura 7. Testículo de *Artibeus jamaicensis*. Corte semifino teñido con azul de toluidina. Se observan varios túbulos seminíferos (T), con gran cantidad de espermatozoides en la luz (flechas negras), vasos sanguíneos (vs) en el compartimento intersticial y células de Leydig. (L). 20X.

Figura 8. Túbulo seminífero de *Artibeus jamaicensis*. Corte semifino teñido con azul de toluidina. Se observan espermatogonias en la base del túbulo (flecha negra), espermatocitos primarios en profase (flecha verde), espermatidas en primeras (flecha amarilla) y últimas etapas de la espermiogénesis (flecha rosa) espermatozoides en la luz (flecha café). También se observaron núcleos de células de Sertoli cerca de la lámina basal y parte de su citoplasma envolviendo a las espermatidas en últimas etapas de espermiogénesis. Lumen (L). Lámina basal (LB) 40X.

Figura 9. *Testículo de Artibeus jamaicensis* en la estación de otoño. Se observan túbulos seminíferos (T) sin lumen, con un epitelio germinal compuesto de espermatogonias (E), espermatocitos primarios (Es) y espermatidas redondas (Er). También se aprecian túbulos seminíferos con lumen ocupado por espermatozoides y un epitelio germinal completo de espermatogonias a espermatozoides (S). A. 20x B. 40 X. C. 100 X.

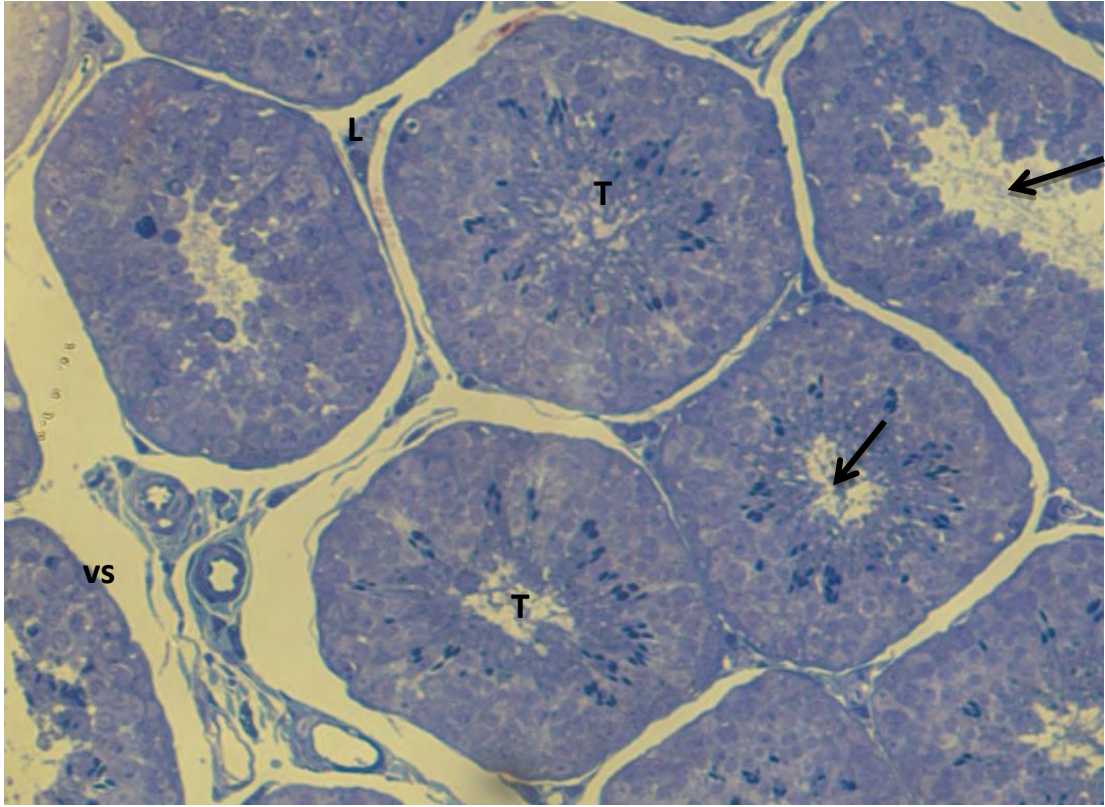


Figura 7

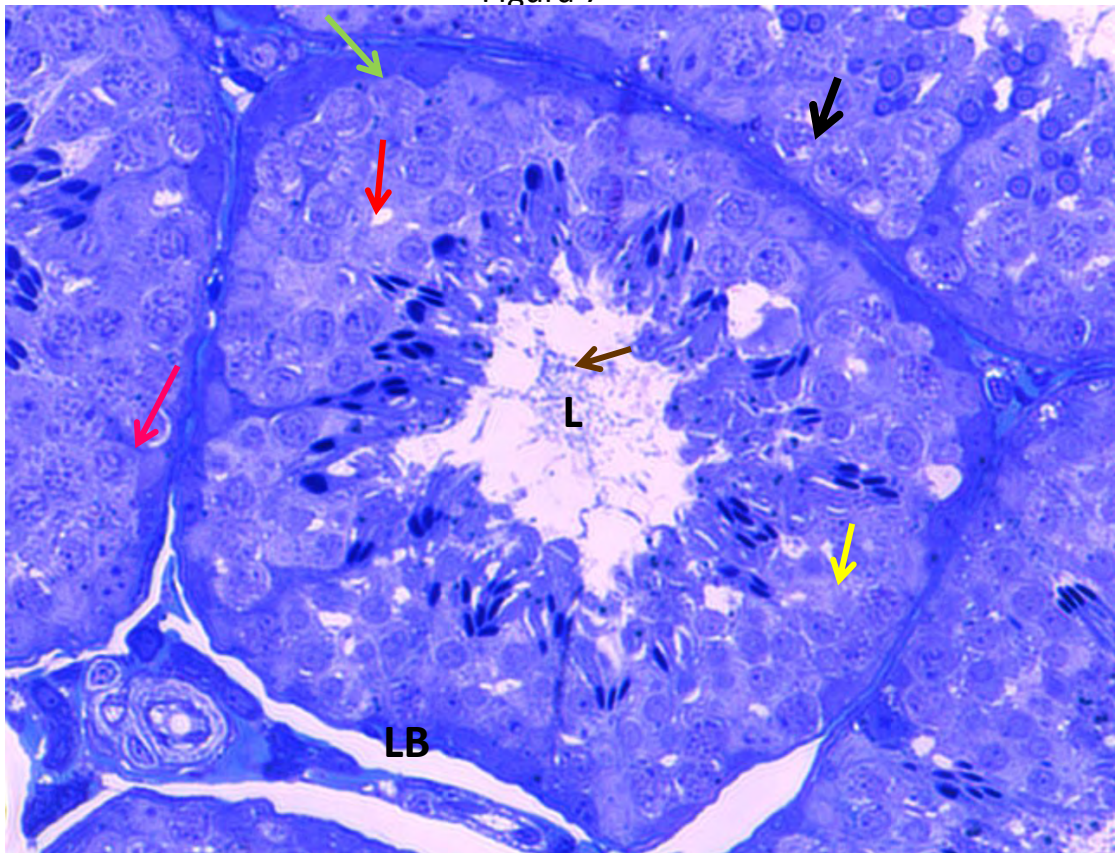
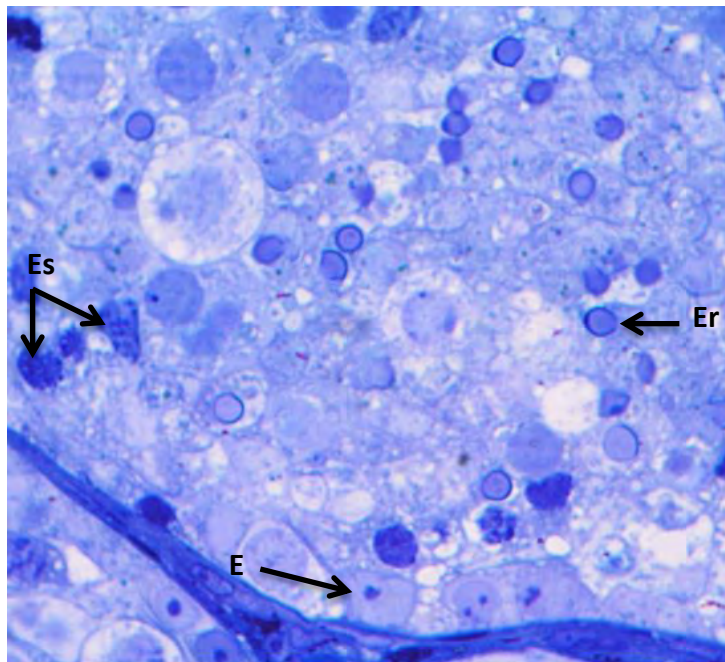
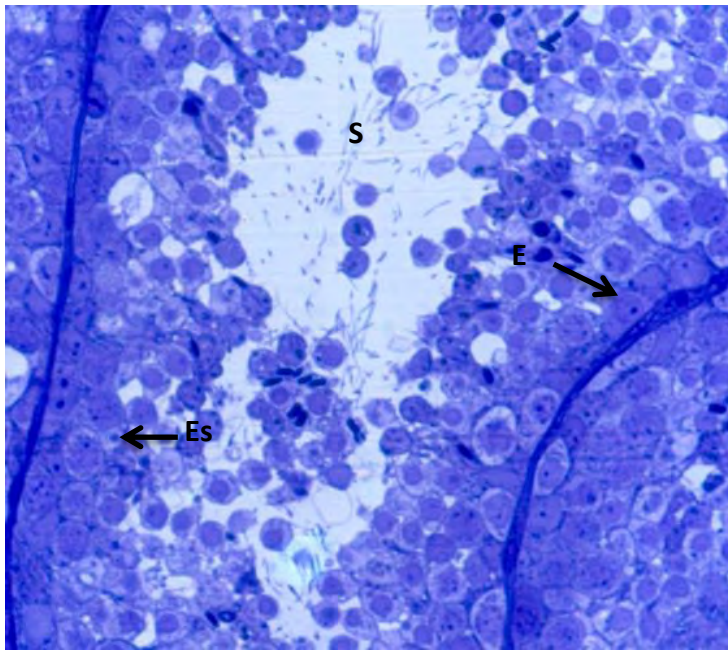
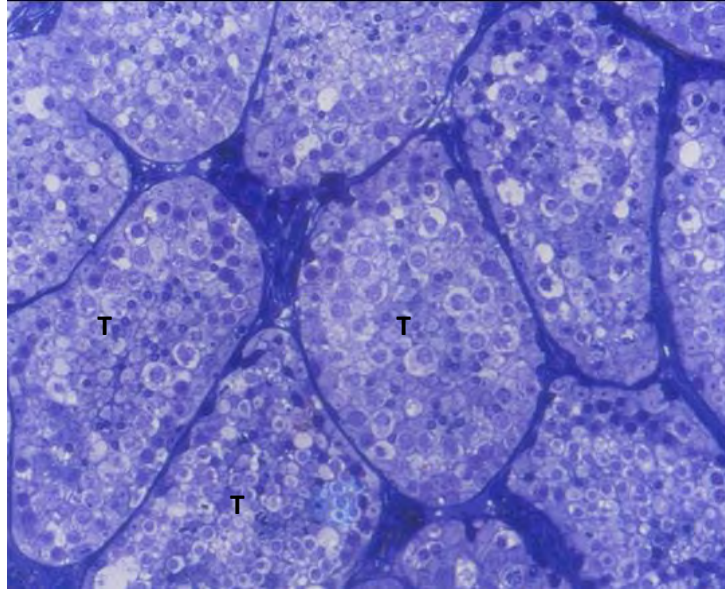


Figura 8

Figura 9



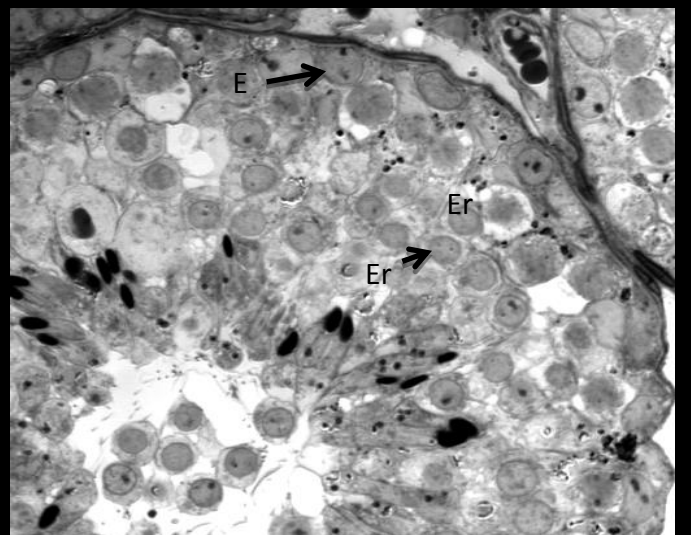
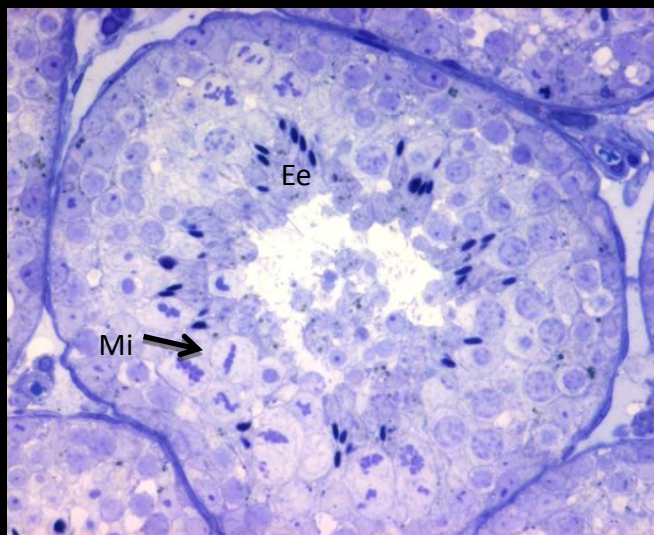
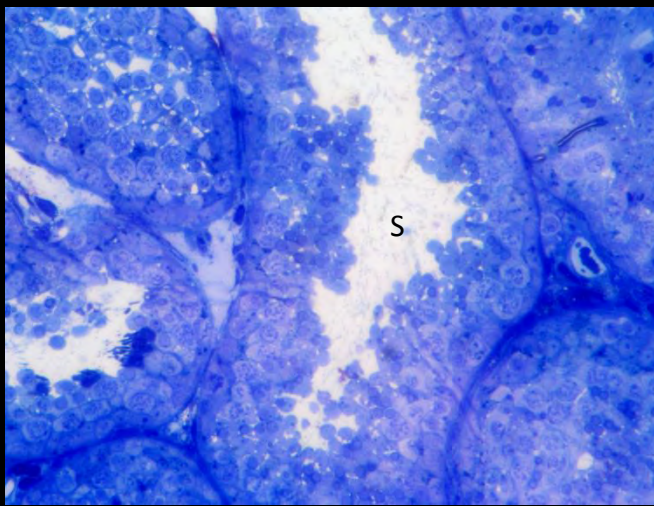
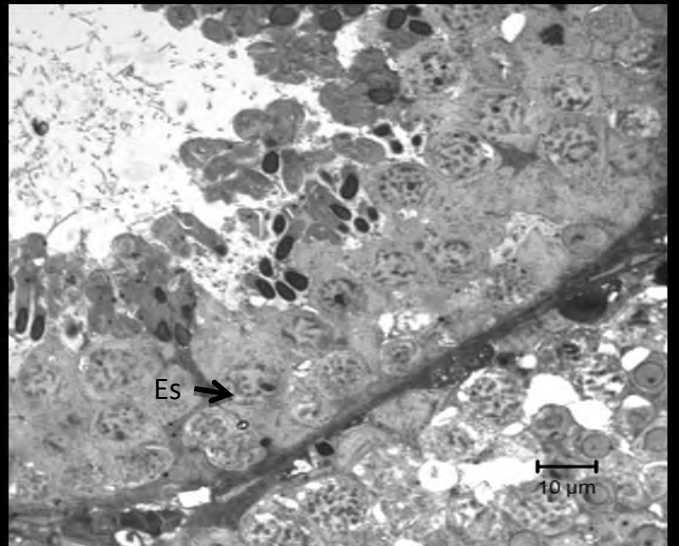
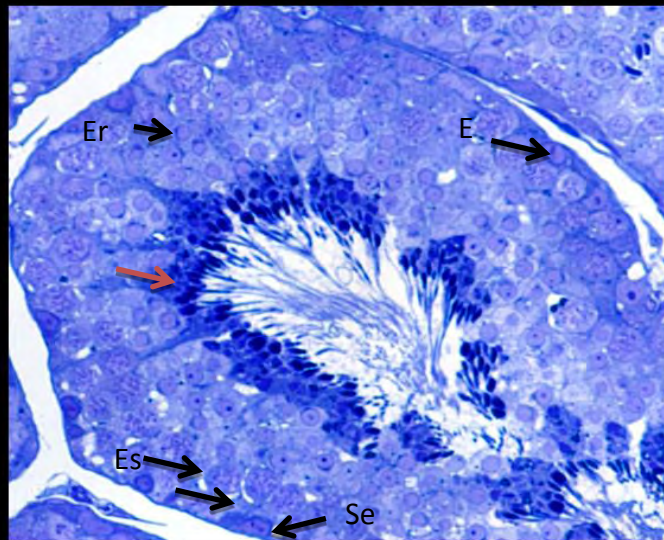


Figura 10. Testículo de *Artibeus jamaicensis* en la estación de invierno (A,B). Primavera (C,D). Verano (E,F). Se observan túbulos seminíferos con un epitelio germinal compuesto por espermatogonias (E), Espermatocitos en paquiteno (Es), Espermatocitos en división mitótica (M), espermatídas redondas (Er), espermatídas elongadas (Ee) y espermatozoides en la luz. También se puede apreciar el citoplasma de las células de Sertoli abrazando al epitelio germinal, pero de manera más evidente las cabezas de los espermatozoides en el compartimento adluminal (flecha roja) al igual que núcleos de células de Sertoli (Se), vasos sanguíneos (Vs).

4. Ultraestructura del testículo

Utilizando microscopia electrónica de transmisión se analizó la ultraestructura del testículo de *Artibeus jamaicensis* y se identificaron los principales tipos celulares que conforman al túbulo seminífero.

Espermatogonias Ad (dark type): presentan una forma elíptica y se observan adheridas firmemente a la lámina basal formando proyecciones y depresiones. Se encuentran rodeadas por células de Sertoli en el compartimento basal del epitelio germinal. Presentan un núcleo ovalado que contiene cromatina electrodensa, un nucléolo irregular y citoplasma con pocos organelos (Figura 11).

Espermatogonia tipo Ap (pale type): Presentan una forma más elongada y también se encuentran adheridas a la lámina basal. Tiene un núcleo ovalado con cromatina distribuida homogéneamente y un nucléolo grande. Su citoplasma se observa extenso con más organelos incluidos (Figura 12).

Espermatogonias tipo B: La adhesión a la lámina basal es menos evidente con respecto a los otros tipos de espermatogonias. Se localizan cerca del núcleo de las células de Sertoli y en la parte superior entran en contacto con las células del compartimento adluminal. Tiene un núcleo redondo que contiene cromatina homogénea con un nucléolo centralmente localizado (Figura 13).

Espermatocito primario: Se producen por la división de las espermatogonias tipo B y entran en meiosis, se identificaron por la presencia de los complejos sinaptonémicos que juegan un papel importante en el apareamiento de los cromosomas en la profase I (cigoteno). Se encuentran en el compartimento adluminal y ya no están adheridos a la lamina basal (Figura 14).

Espermátidas: Son el resultado de la división meiótica de los espermatocitos, por lo que su tamaño es menor, son haploides (n) y entran en un proceso morfológico denominado espermiogénesis donde se lleva a cabo la formación del acrosoma, el alargamiento de la célula y formación del flagelo. En el testículo de *A. jamaicensis* se identificaron espermátidas en diferentes etapas del proceso de espermiogénesis (Figura 15, 16, 17).

Espermatozoides: Se producen por el proceso de espermiogénesis, siendo los encargados de fertilizar al óvulo. Están externamente cubiertos por una la membrana plasmática. La cabeza del espermatozoide es de forma redondeada y pequeña, presenta un acrosoma, el cual se encuentra extendido ocupando dos terceras partes del núcleo. Posee una pieza media compuesta por mitocondrias organizadas en espiral para dar energía al flagelo en su desplazamiento. El flagelo presenta un arreglo de 9+2 (Figura 18, 19).



Figura 11. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Se observan espermatogonias tipo Ad con núcleo (N) ovalado, nucléolo irregular (Nu) y las proyecciones hacia la lámina basal (flecha roja). Barra 1 μm .

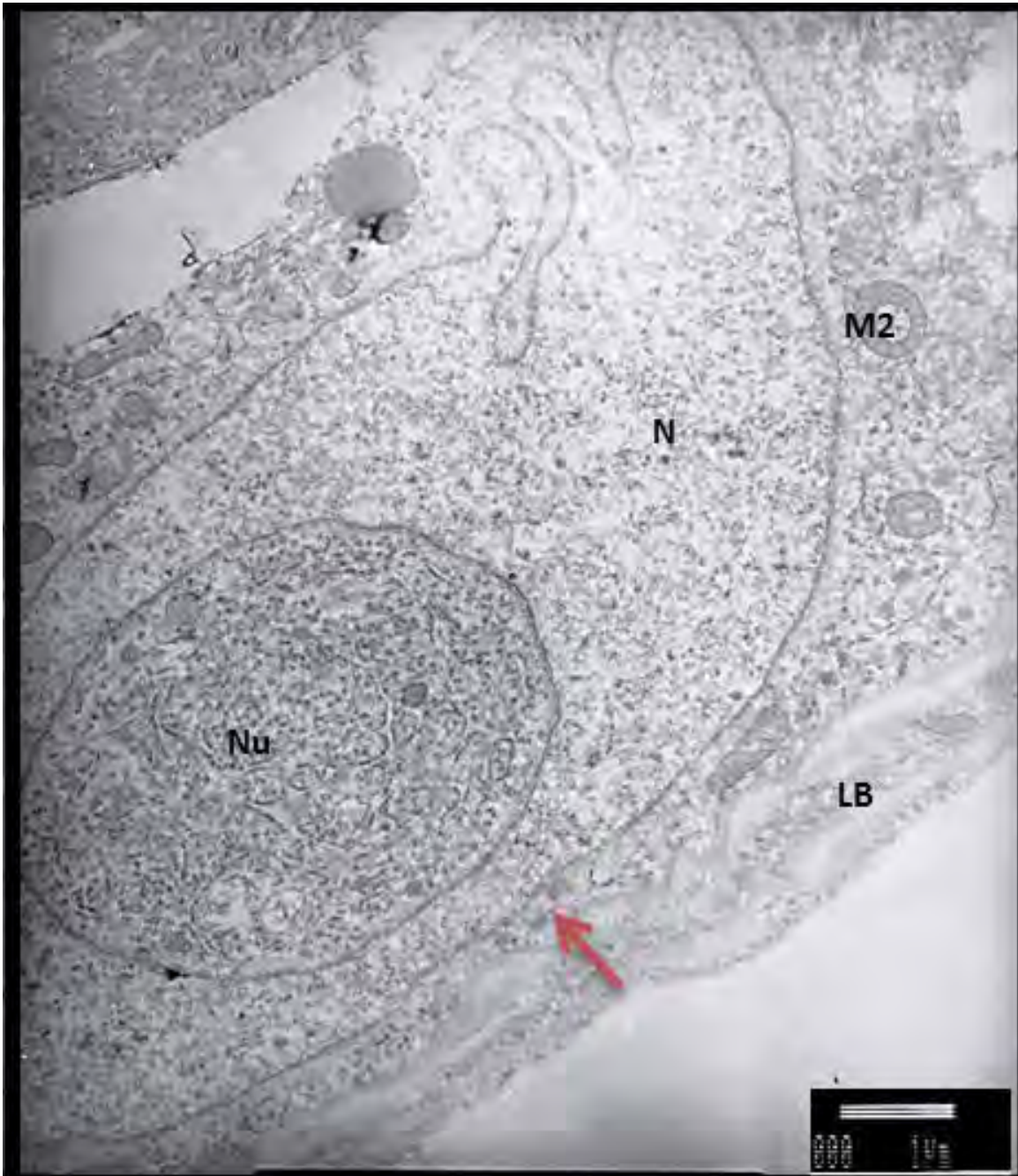


Figura 12. Micrografías electrónicas del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Espermatogonia tipo Ap con un nucléolo grande (Un), con un citoplasma amplio con presencia de mitocondrias en forma de dona (M2). Proyecciones hacia la lámina basal (flecha roja). Barra 1 μm .



Figura 13. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Espermatogonia tipo B con núcleo redondo (N), un nucléolo (Nu). Se encuentra separada de la lámina basal, tiene un amplio citoplasma con mitocondrias (M1) y en forma de dona (M2), así como aparato de Golgi. Barra 500 nm.

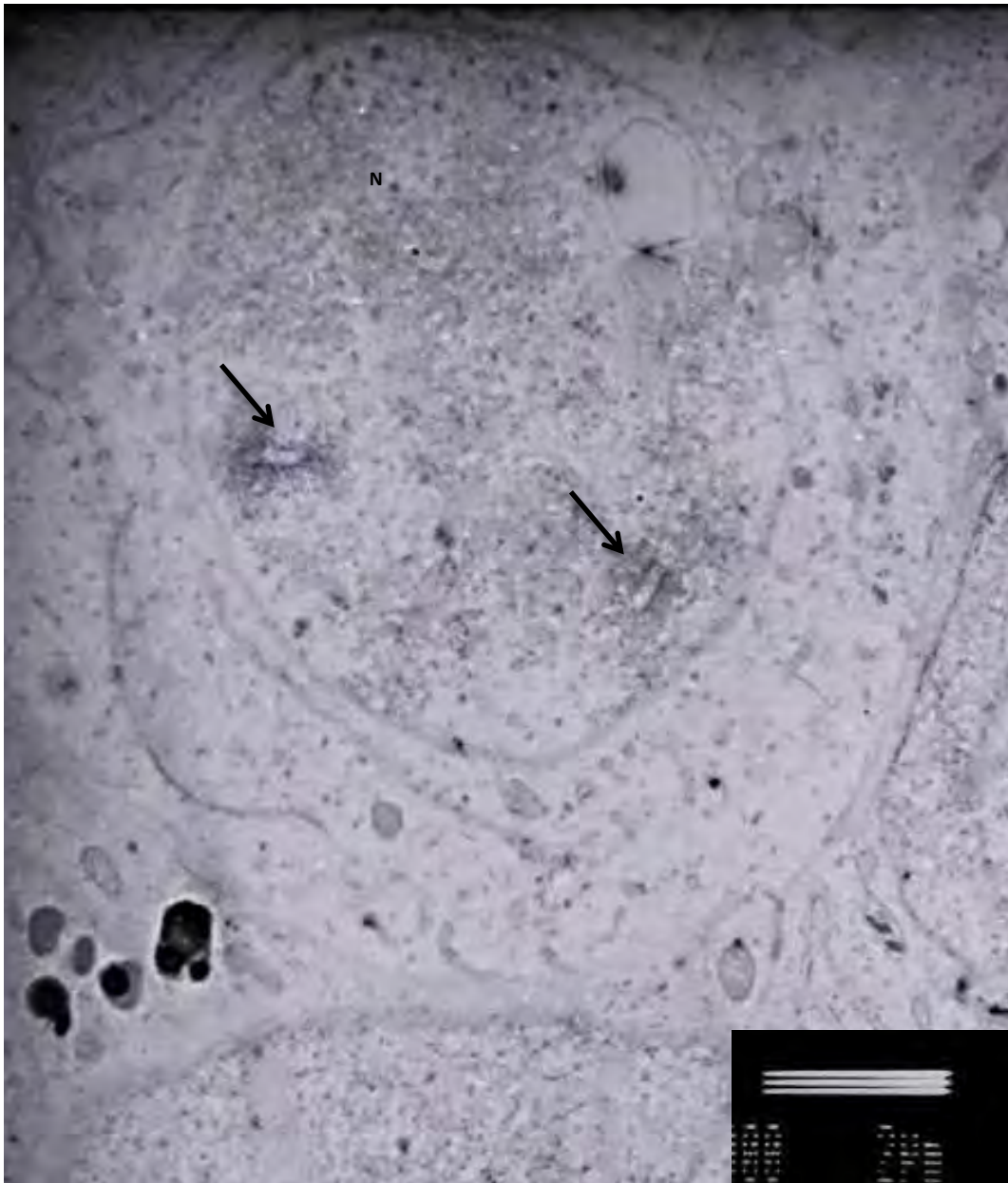


Figura 14. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Espermatocito primario identificado por los complejos sinaptonémicos (flechas negras) presentes en la etapa de cigoteno. Barra 2 μm

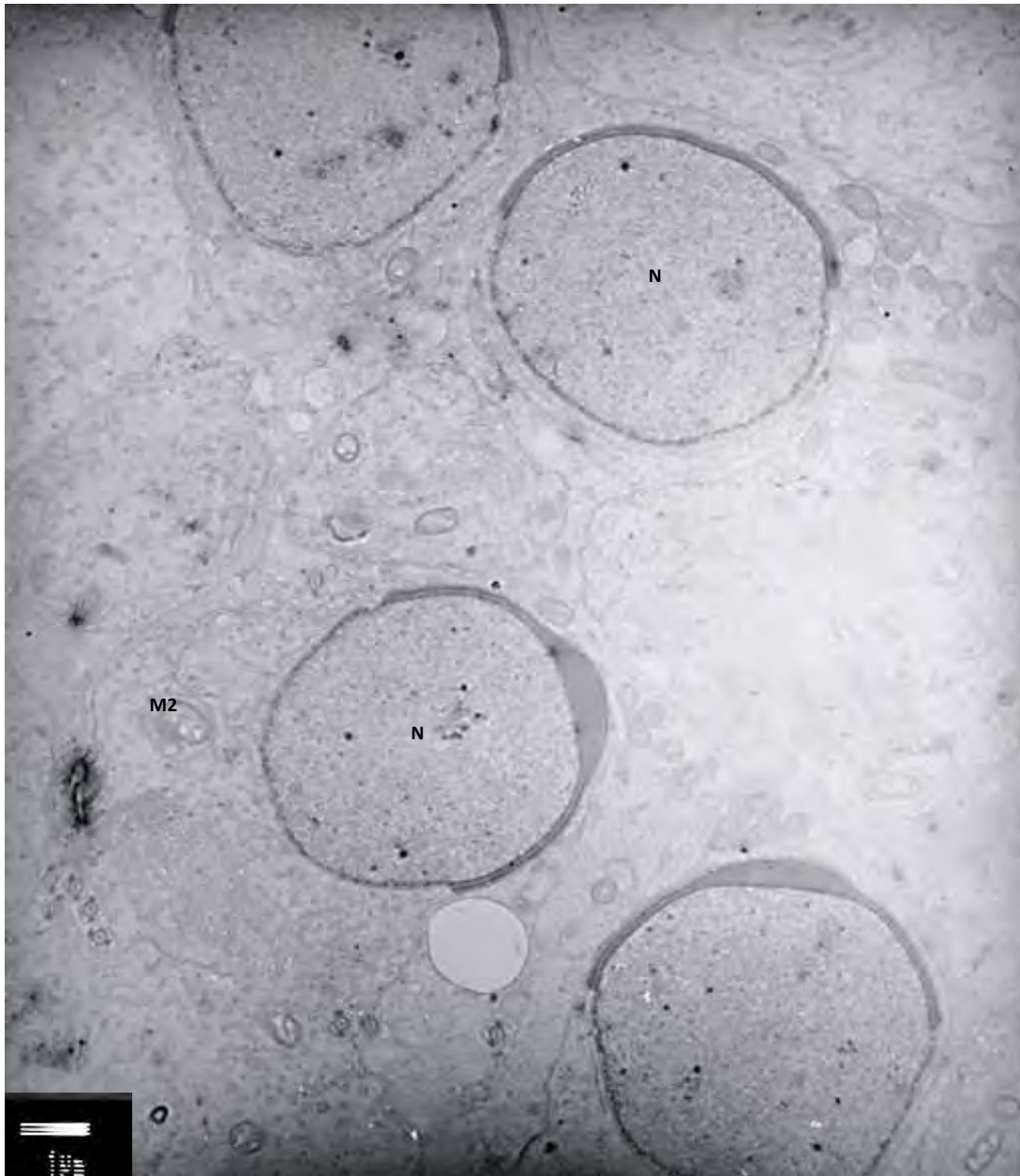


Figura 15. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Espermátidas redondas con un núcleo esférico y acrosoma rodeando la parte superior del núcleo localizadas en el compartimento adluminal. Presentan gran cantidad de citoplasma. Barra 1 μm .

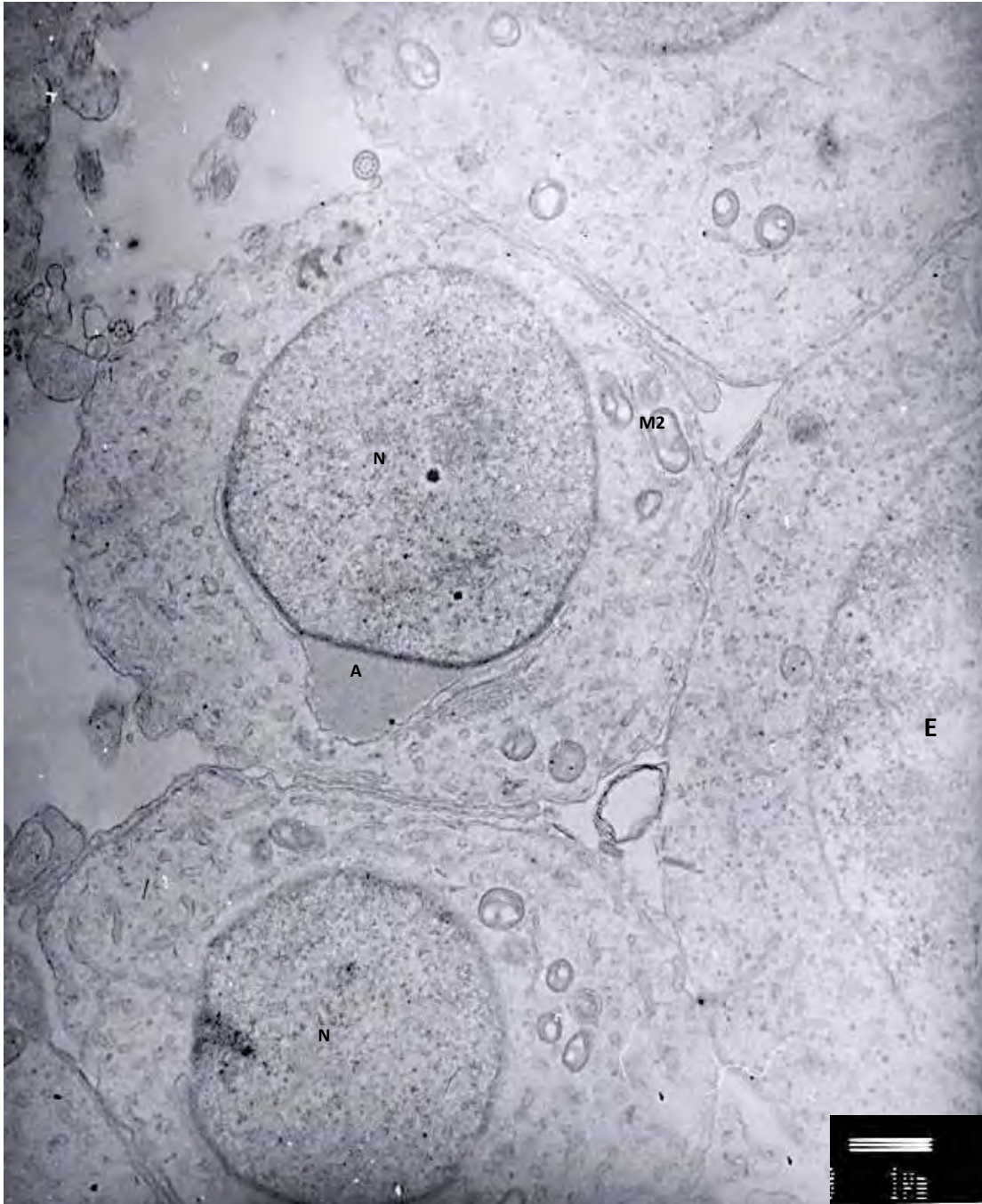


Figura 16. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. A. Espermatidas redondas. Ubicadas cerca de los espermatocitos (E) de los que pueden diferenciarse por el tamaño. En esta etapa de la espermiogénesis el citoplasma aún se encuentra rodeando la superficie nuclear y se observa bien delimitado con presencia de mitocondrias en forma de dona (M2). Barra 1 μm .

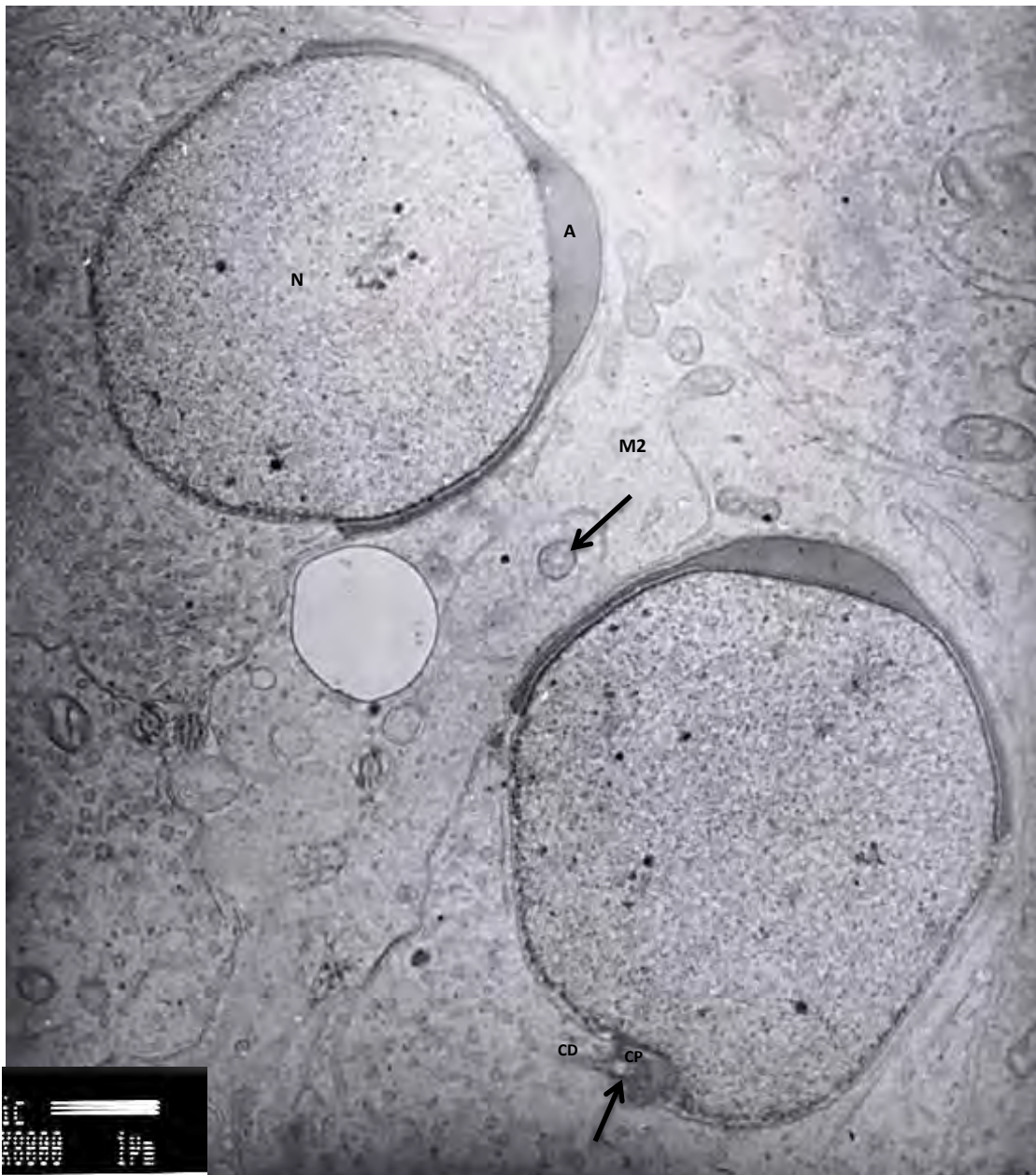


Figura 17. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. A. Espermatidas redondas. Se puede apreciar el inicio de la formación del flagelo (flecha negra) a partir del centriolo distal (CD) estando el centriolo proximal (CP) ubicado en la unión de la cabeza con el flagelo del espermatozoide. El citoplasma se está desplazando hacia la parte posterior. Barra 1 μm .



Figura 18. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Espermatozoides que serán liberados a la luz del túbulo seminífero con sus cabezas orientadas hacia la lámina basal. Presentan un núcleo alargado un acrosoma que se extiende terminando en una punta redonda. El acrosoma presenta una membrana acrosomal interna (I) y externa (E). Barra 500 nm.



Figura 19. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Presentan un núcleo alargado y un acrosoma que presenta una membrana acrosomal interna (I) y externa (E). Se observa la pieza media compuesta por mitocondrias organizadas en espiral (M) y un flagelo (F) observado de forma horizontal presentando el axonema. Se aprecia la gota citoplasmática (G) en la parte anterior del flagelo. Barra 1 μ m.

En relación al linaje somático, en el testículo de *Artibeus jamaicensis* se pudieron identificar a las células de Sertoli, las cuales se observaron con un núcleo irregular con cromatina homogénea y localizadas cerca de la lámina basal del túbulo seminífero. El citoplasma de Sertoli se prolonga envolviendo al epitelio germinal. Es importante identificarlas debido a la funcionalidad en el testículo ya que las células de Sertoli y las células germinales en desarrollo ofrecen uno de los ejemplos más complejos de las interacciones célula-célula, porque hay una gran diversidad en contactos morfológicos o interrelaciones entre las células somáticas y germinales como resultado de patrones variables de la espermatogénesis (Figura 20).

Otro tipo celular importante en la función testicular son las células de Leydig. Este linaje celular se localiza en el compartimento intersticial, cumpliendo una función indispensable en la síntesis de testosterona esencial para el buen funcionamiento del testículo y de los órganos reproductores secundarios. Al ser una célula secretora presenta gránulos de gotas lipídicas y abundantes peroxisomas (Figura 21).

También se encuentran las células mioideas rodeando al túbulo seminífero; estas células somáticas marcan al límite externo de los túbulos seminíferos. Las células mioideas peritubulares (miofibroblastos) rodean el borde exterior del epitelio seminífero y tocan la lámina basal de células de Sertoli y espermatogonias. Exhiben contracciones que contribuyen al movimiento de los espermatozoides y el fluido a través del confinamiento luminal de los túbulos seminíferos, además están envueltas en señales parácrinas (Figura 22).

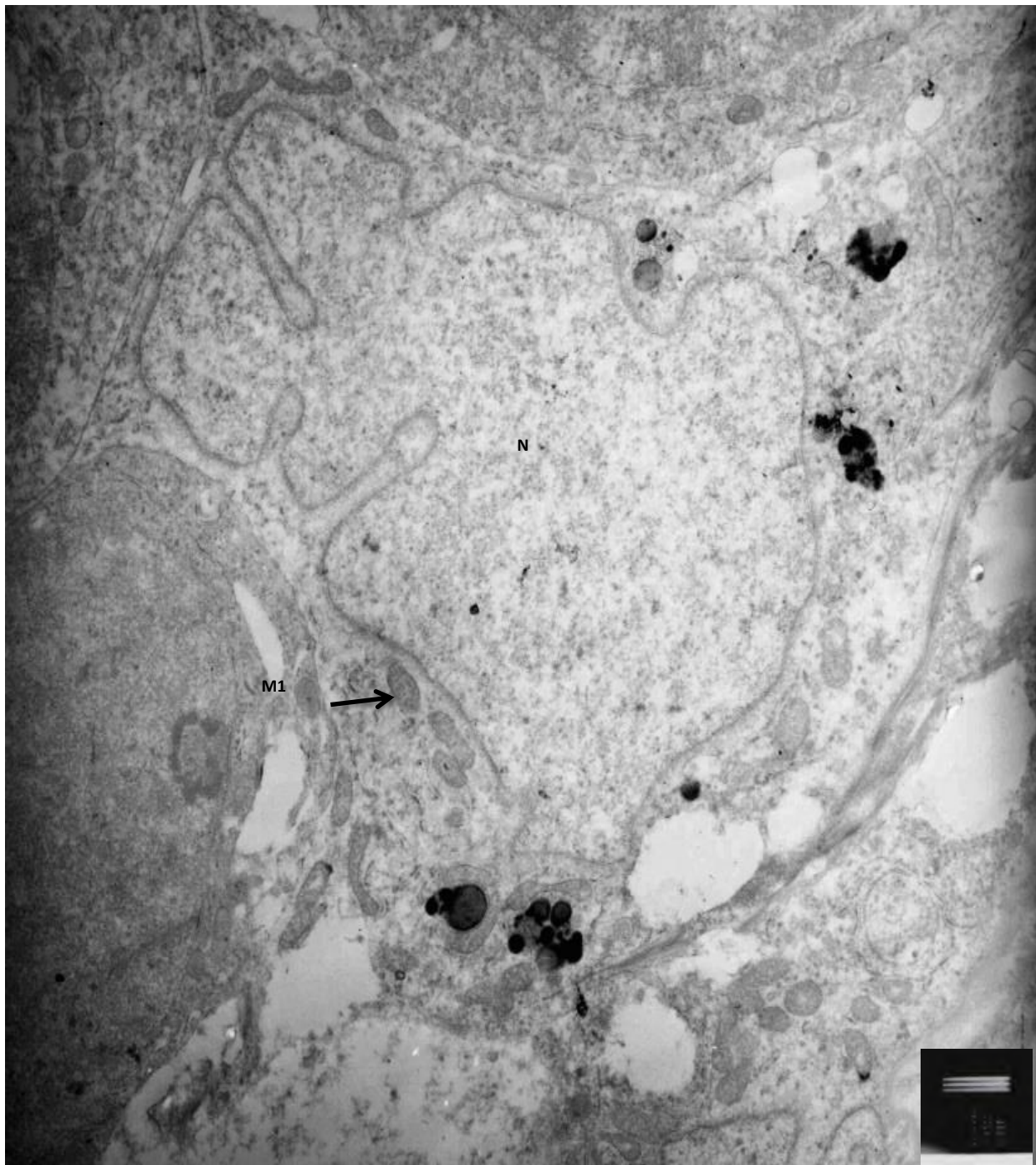


Figura 20. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Célula de Sertoli con núcleo irregular y presencia de mitocondrias en el citoplasma, junto a ella se observan espermatogonias envueltas en su citoplasma. Barra 1 μm .

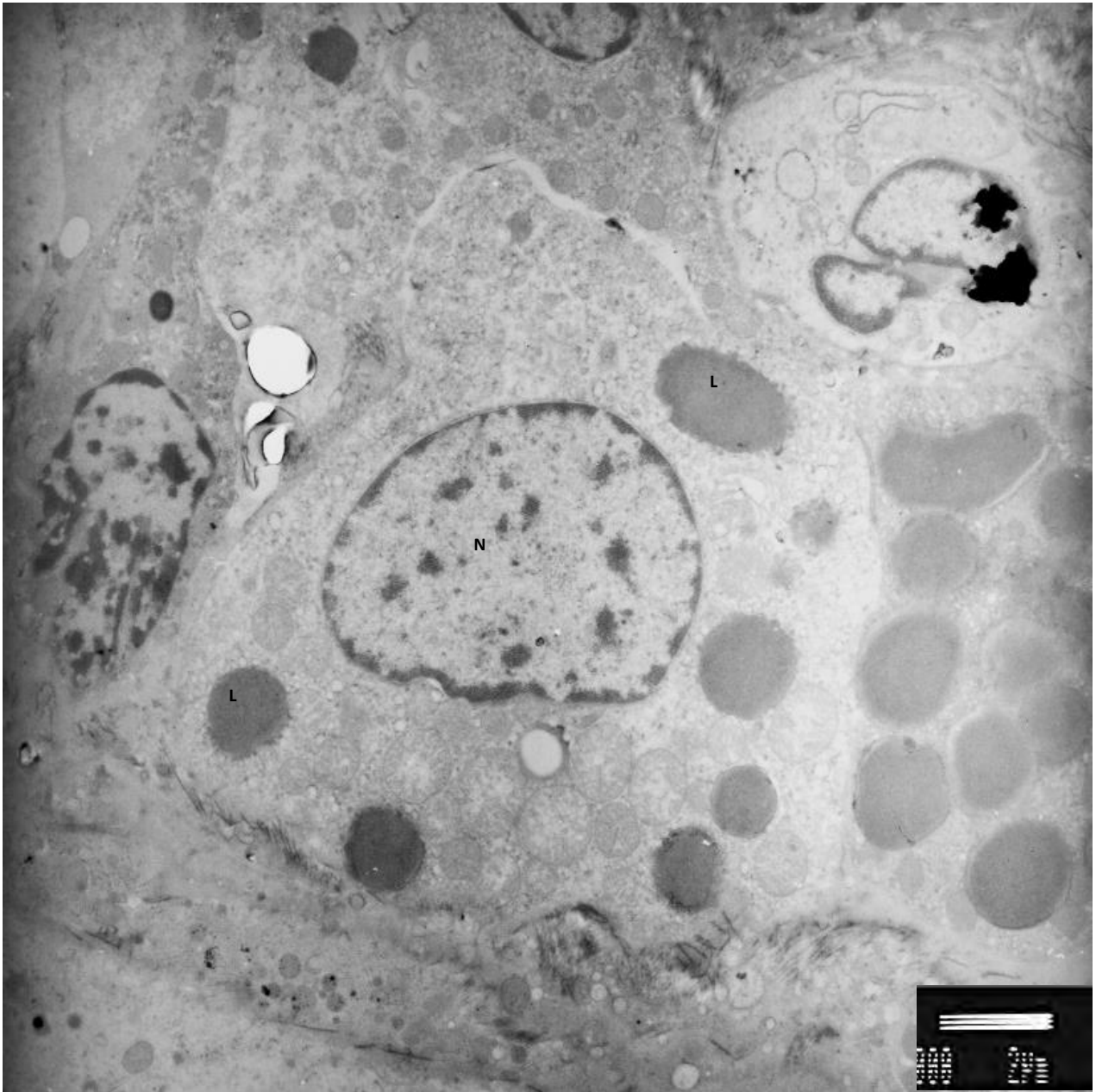


Figura 21. Micrografía electrónica del testículo *Artibeus jamaicensis*. Célula de Leydig identificada por la gran cantidad de gotas lipídicas en su citoplasma (L). Barra 2 μm .

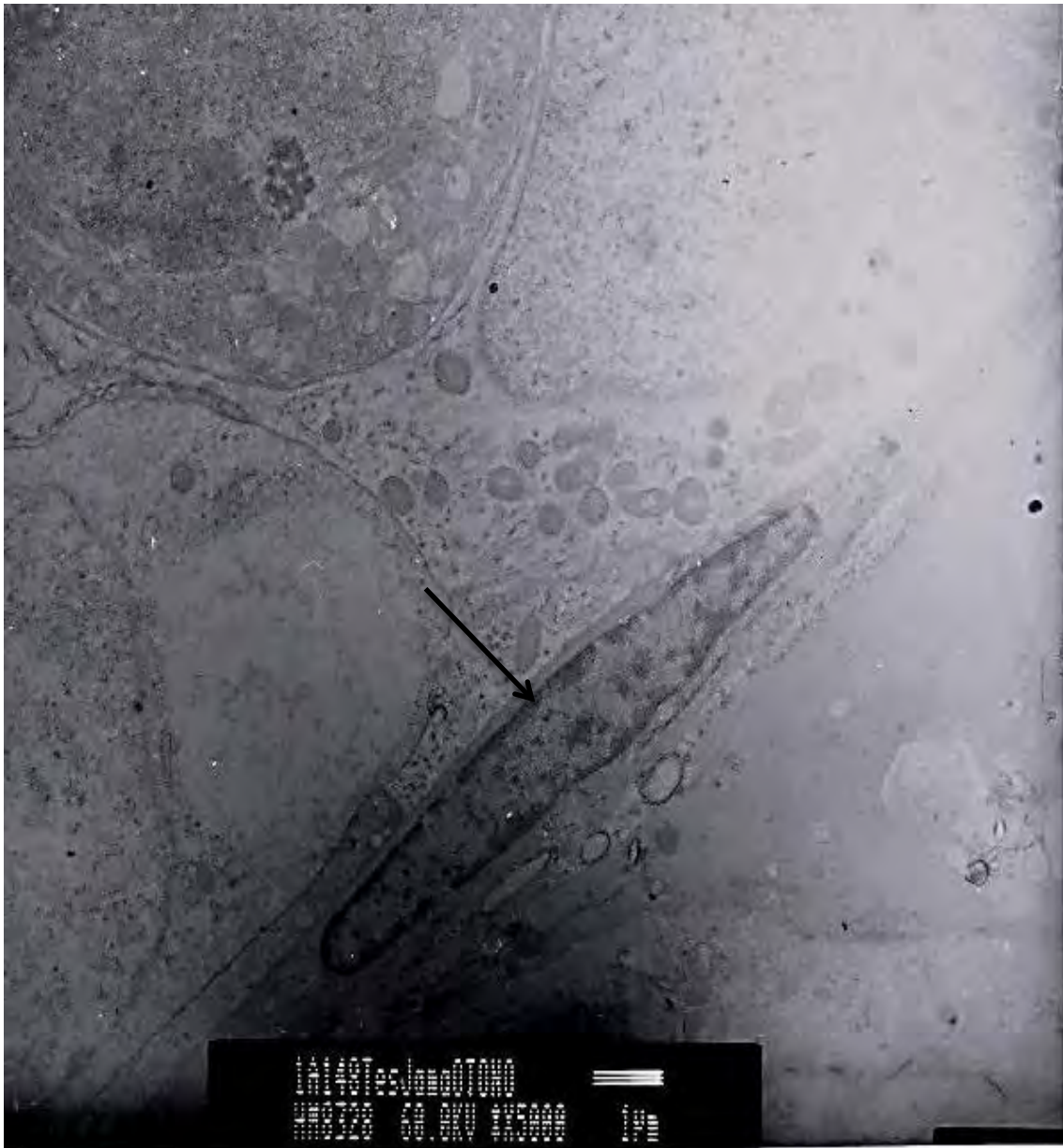


Figura 22. Micrografía electrónica del testículo de *Artibeus jamaicensis*. Célula mioide (flecha) cerca de la base del túbulo seminífero con núcleo alargado al igual que el citoplasma. Barra 1 μm .

I. Ciclo del epitelio seminífero

Se identificaron nueve etapas del ciclo del epitelio seminífero de acuerdo al sistema acrosómico descrito por Clermont Y. (1972). En dicho método se toma en cuenta el proceso de espermiogénesis. No se establecieron las etapas de espermiogénesis detalladamente, pero se identificaron las etapas del ciclo de acuerdo a la formación del acrosoma. En las figuras 16 y 17 se ilustran las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero identificadas en *A. jamaicensis*.

ETAPA I: Inicia con la aparición de un nuevo grupo de espermatidas derivada de la segunda división de los espermátocitos secundarios. Cerca de la membrana basal se pueden observar las espermatogonias de tipo A y núcleos de Sertoli. También se observan espermatidas elongadas en la fase de maduración localizadas en la superficie adluminal.

ETAPA II: Comienza con la aparición de los gránulos proacrosómicos de las espermatidas jóvenes que se fusionan en uno solo formando la vesícula acrosomal, finalizando la fase Golgi. Se observan espermatogonias tipo A, espermátocitos secundarios en paquiteno en mayor cantidad y espermatidas elongadas.

ETAPA III: El acrosoma se sigue extendiendo lateralmente en las espermatidas jóvenes. Se observan espermátocitos secundarios en paquiteno y cerca del lumen se observan espermatozoides que aún siguen anclados en el citoplasma de las células de Sertoli que pronto serán liberados.

ETAPA IV: Continúa la extensión del acrosoma en las espermatidas redondas, donde se observa un nucléolo muy evidente. Cerca de ellas se encuentran espermatidas elongadas con núcleos elongados y flagelos largos embebidos en el epitelio germinal del túbulo seminífero. En la luz del túbulo seminífero hay presencia de espermatozoides.

ETAPA V: El acrosoma cubre la mitad de la superficie nuclear de las espermatidas redondas. Ya no aparecen espermatidas elongadas, puesto que ya han madurado en un espermatozoide y han sido liberados al lumen del túbulo. Por lo tanto, el espesor del epitelio se reduce y consecuentemente, el lumen del túbulo es más grande que en otras etapas.

ETAPA VI: El acrosoma ya cubre las dos terceras partes del núcleo. El núcleo comienza a elongarse y desplazarse hacia a la región posterior de la espermatida. Se puede observar gran cantidad del citoplasma que cubre a dichas espermatidas que se encuentran en la zona adluminal. También se observan espermátocitos en paquíteno y diploteno.

ETAPA VII: Continúa la elongación del núcleo de las espermatidas, las cuales tienen el acrosoma orientado hacia dentro del túbulo seminífero. La mayor parte del epitelio germinal está compuesto de espermátocitos en división cerca de la lámina basal.

ETAPA VIII: Continúa la elongación de las espermatidas, el citoplasma de dichas espermatidas está desplazado hacia la parte posterior, el cual se encuentra en el lumen del túbulo. Se observan espermátocitos primarios en profase I (paquíteno, cigoteno y diploteno). Esta etapa se caracteriza por la presencia de figuras meióticas resultantes de las divisiones de espermátocitos primarios o secundarios.

ETAPA IX: En esta última etapa se observa una mayor elongación de las espermatidas en espermiogénesis con el citoplasma en la parte posterior de cada una de ellas y con sus flagelos en la luz del túbulo seminífero. También se encuentran espermátocitos en división mitótica y meiótica.

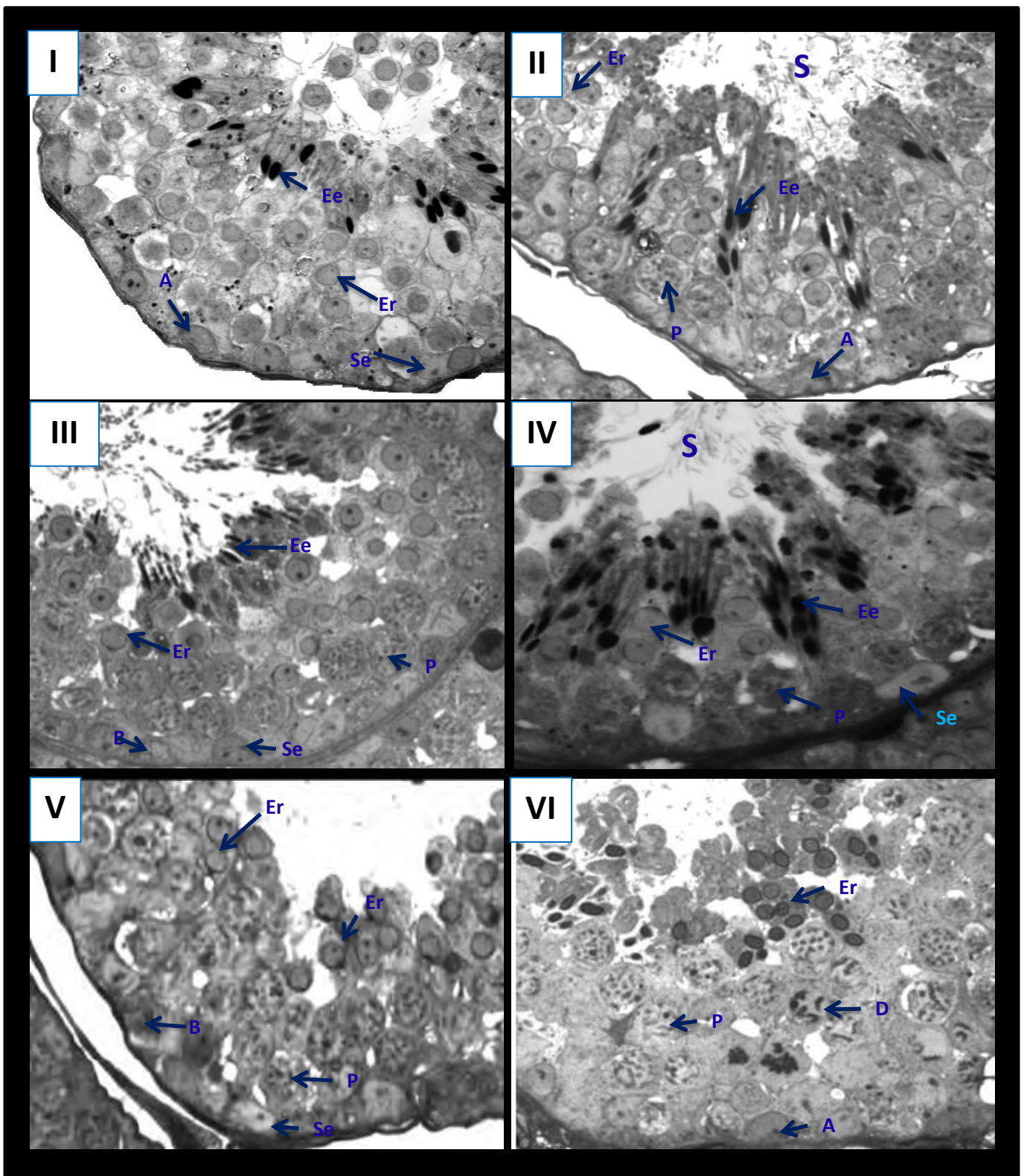


Figura 23. Etapas I a VI del ciclo del epitelio seminífero de *Artibeus jamaicensis*. Se distinguen espermatogonias tipo A (A), tipo B (B), espermatocitos primarios en paquiteno (P) y diploteno (D), espermatidas redondas (Er), espermatidas elongadas (Ee) y espermatozoides (S).

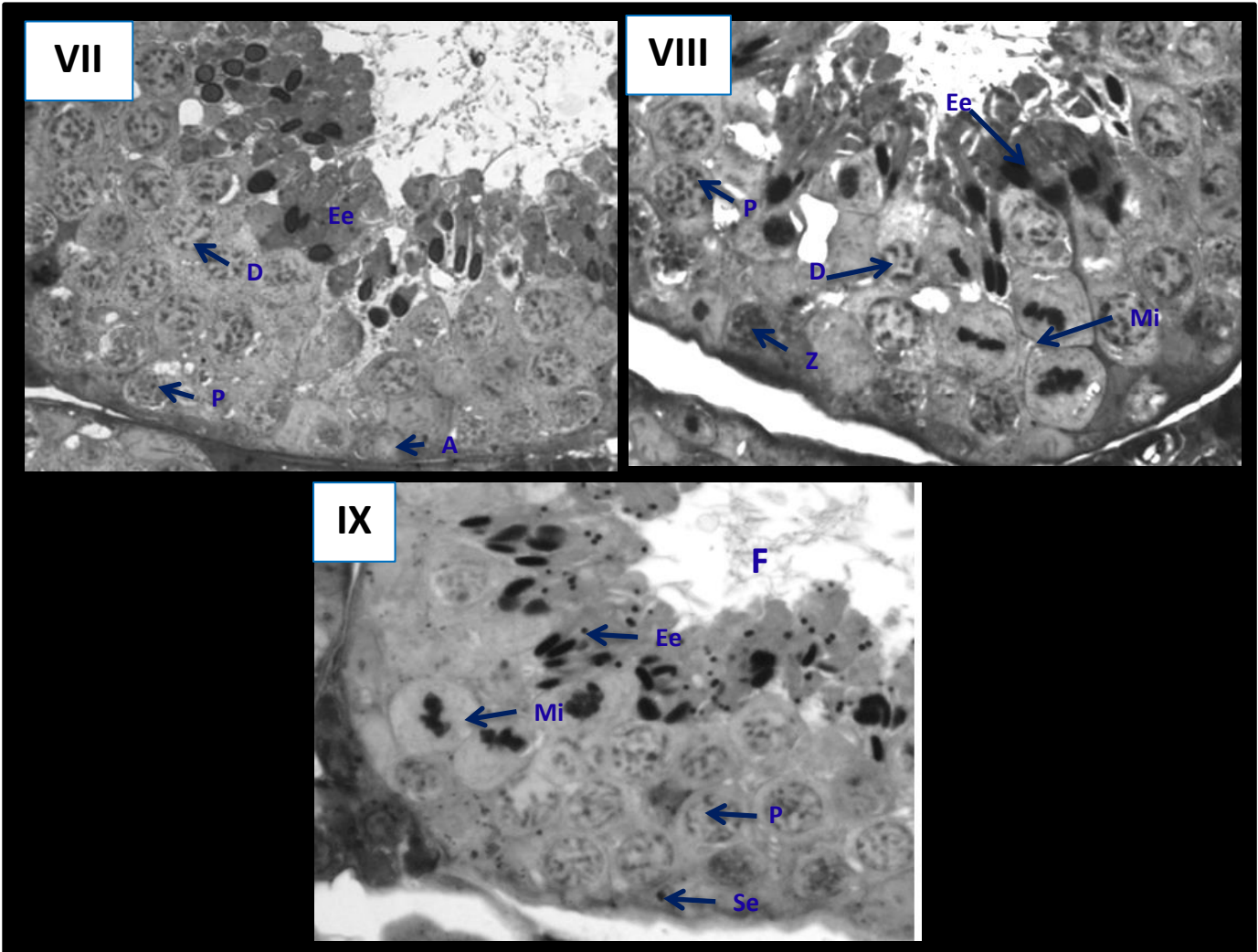


Figura 24. Etapas VII-IX del ciclo epitelio seminífero. Se presentan espermatogonias tipo A (A), espermatocitos primarios en paquiteno (P), cigoteno (z), diploteno (D), espermatocitos en mitosis (Mi), espermátidas redondas (Er) y espermátidas elongadas (Ee) y espermatozoides (S).

IV.- Detección de proteínas

Vasa

Se detectó en el citoplasma de espermatogonias en la base del túbulo seminífero. Dicha proteína estuvo presente en túbulos seminíferos de individuos colectados en las cuatro estaciones del año.

Sox9

Se detectó en núcleos de células de Sertoli, cerca de la base del túbulo seminífero reflejando la funcionalidad del tipo celular en el proceso espermatogénico. Su expresión persistió a lo largo del año en los testículos de *Artibeus jamaicensis*.

C-kit

Se observó la presencia de este receptor c-kit en el núcleo de las espermatogonias, el cual es un marcador de células totipotenciales. Se pudo identificar perfectamente a dichas células. El marcaje se encontró en las cuatro estaciones.

PH3

La proteína histona 3 fosforilada fue utilizado como un marcador de proliferación, por ende, se observó su marca en espermatogonias al ser el tipo celular que entra en un proceso mitótico para mantener una población permanente del epitelio germinal que entraran a un proceso espermatogénico a lo largo del año, su marcaje persistió en las cuatro estaciones del año, aunque hubo diferencias en cuanto a las células marcadas en el campo analizado.

Las inmunofluorescencias dobles de pH3-Ckit y pH3-Vasa fueron útiles para identificar perfectamente las espermatogonias que se encuentran proliferando dentro del túbulo seminífero, reconociendo que no todas ellas proliferan al mismo tiempo siendo su división asincrónica. Esta asincronía resulta aceptable para mantener una producción espermática a lo largo del año en el transcurso de toda su vida.

Por medio de la Inmunofluorescencia doble de Sox9-Vasa se pudo identificar los dos linajes celulares implicados en el proceso de espermatogénesis. Con la proteína Sox9 identificamos las células de Sertoli que juegan un papel importante en el proceso y con Vasa las células espermatogénicas que conforman al epitelio germinal y que se transformaran en espermatozoides (Figuras 25-28).

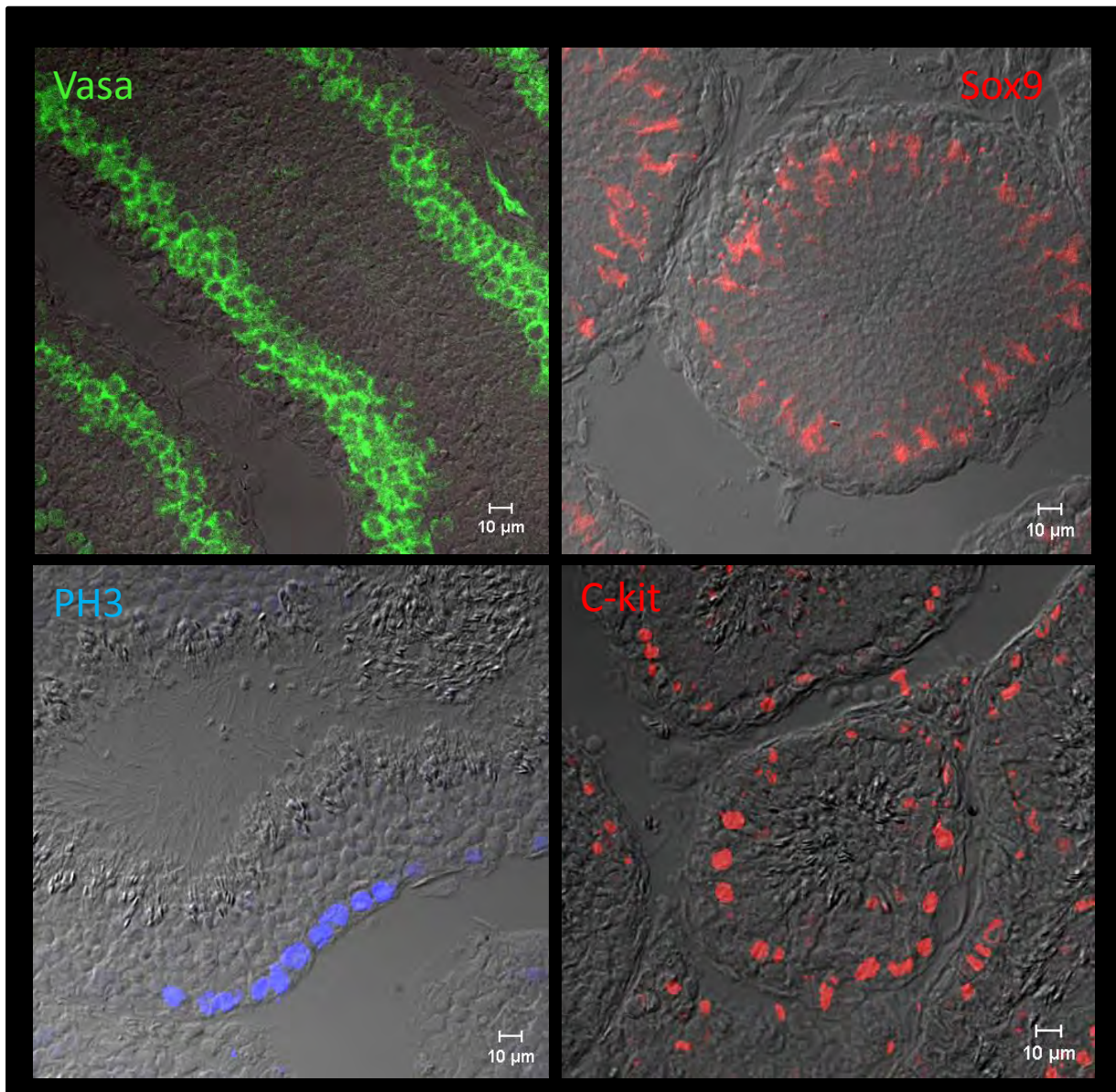


Figura 25. Detección de las proteínas Vasa, Sox9, p3 y C-kit en el testículo de *Artibeus jamaicensis*. Vasa y C-kit ubicando las espermatogonias cerca de la lámina basal. p3 en células dividiéndose y Sox9 en el núcleo de Sertoli. En verano.

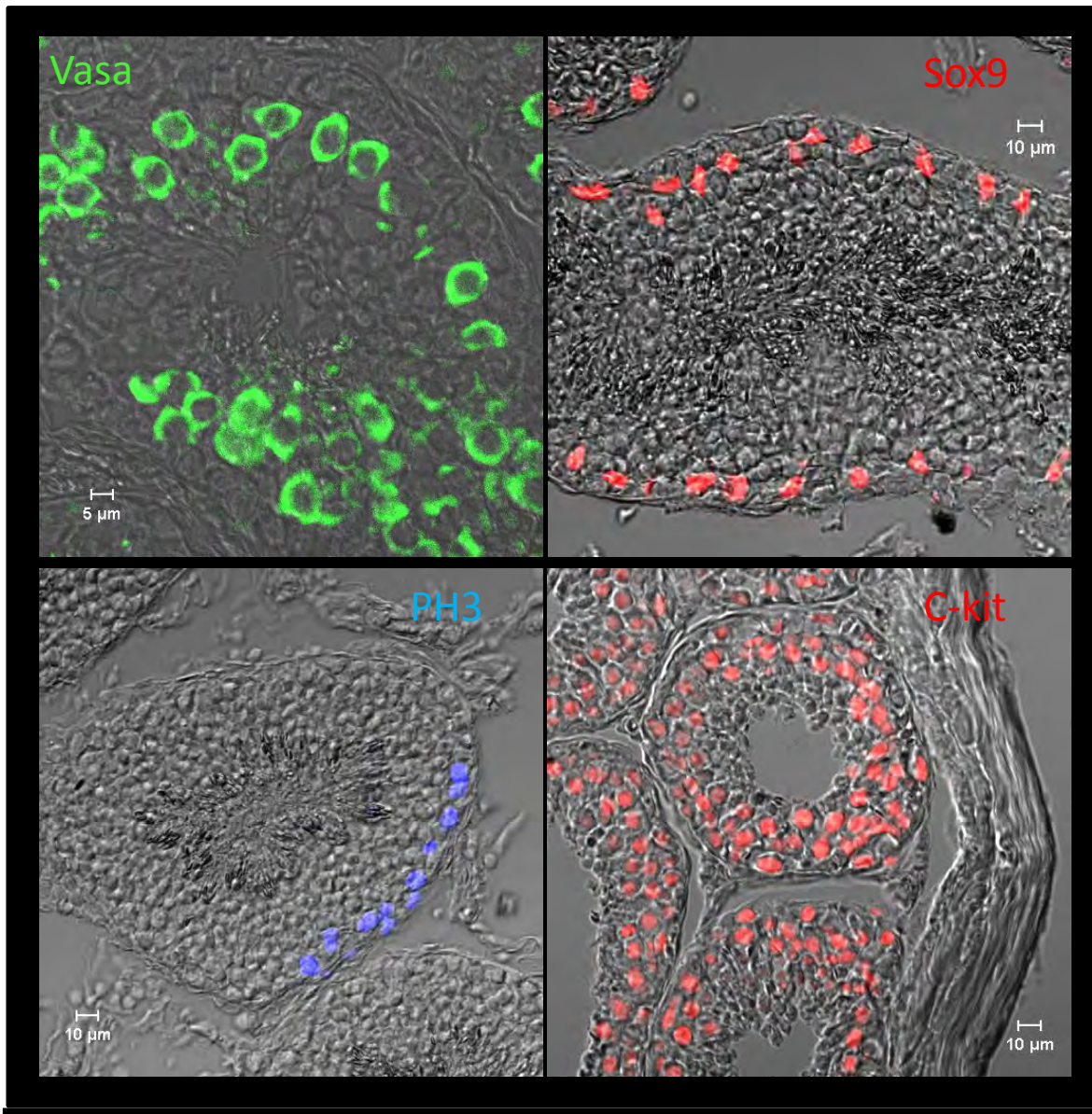


Figura 26. Detección de las proteínas Vasa, Sox9, pH3 y C-kit en el testículo de *Artibeus jamaicensis*. Espermatogonias con citoplasma marcado con Vasa y núcleo con C-kit. Las células en división marcadas con Ph3 y los núcleos de Sertoli con Sox9. En otoño.

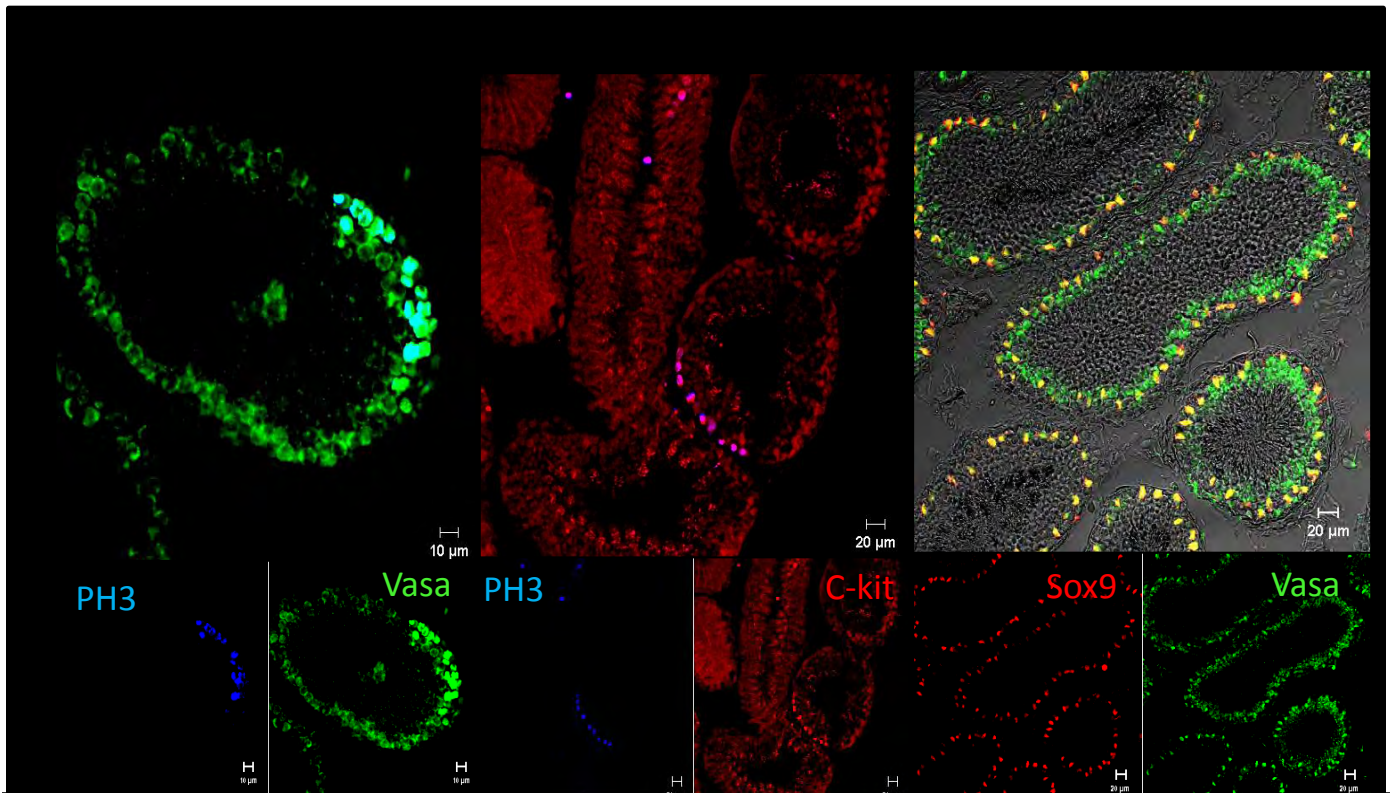
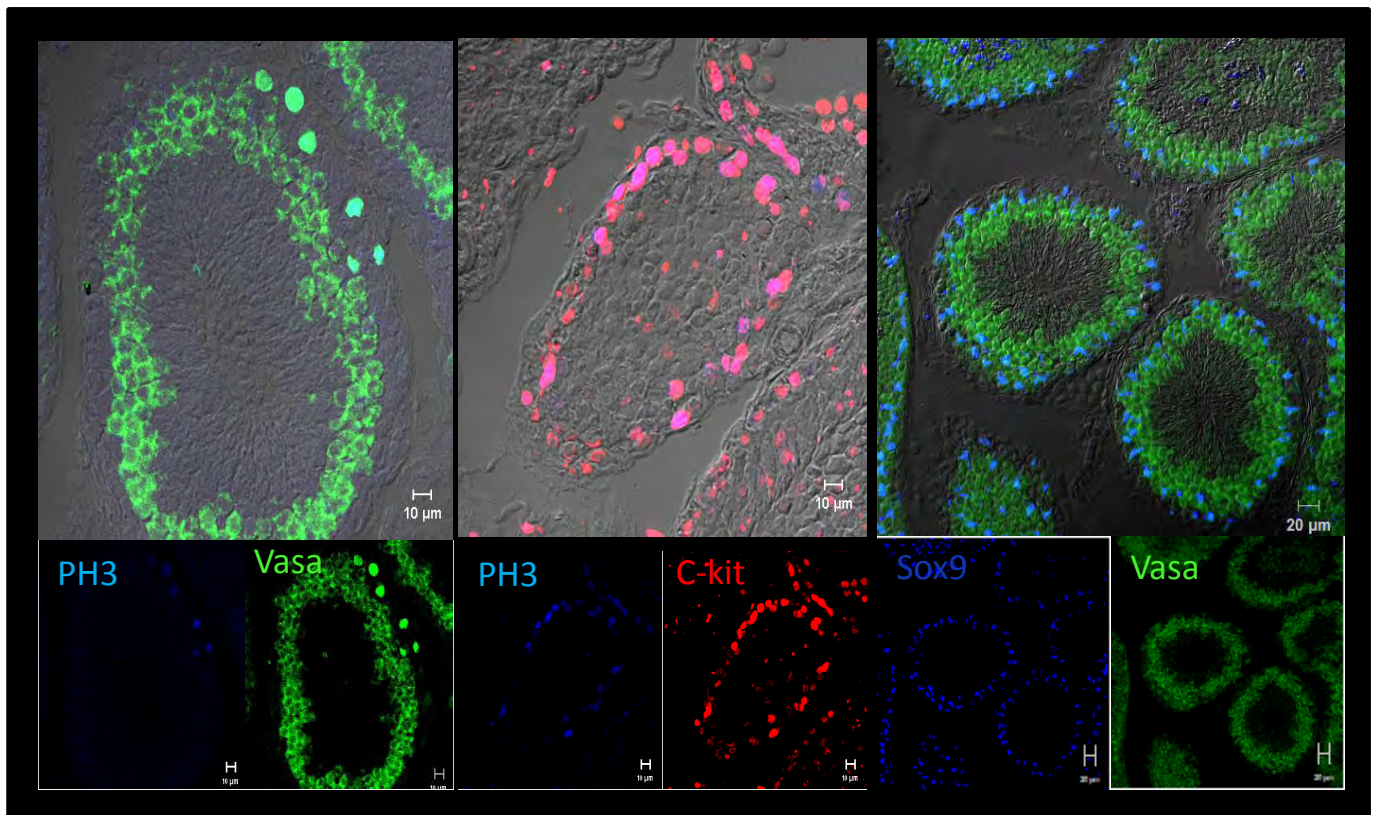


Figura 27. inmunofluorescencias dobles del testículo de *Artibeus jamaicensis*. PH3-Vasa en espermatogonias proliferando, PH3-Ckit ubicando núcleos de espermatogonias en la base del túbulo seminífero y Sox9-Vasa en Sertoli y germinales respectivamente. En de Verano y Otoño.

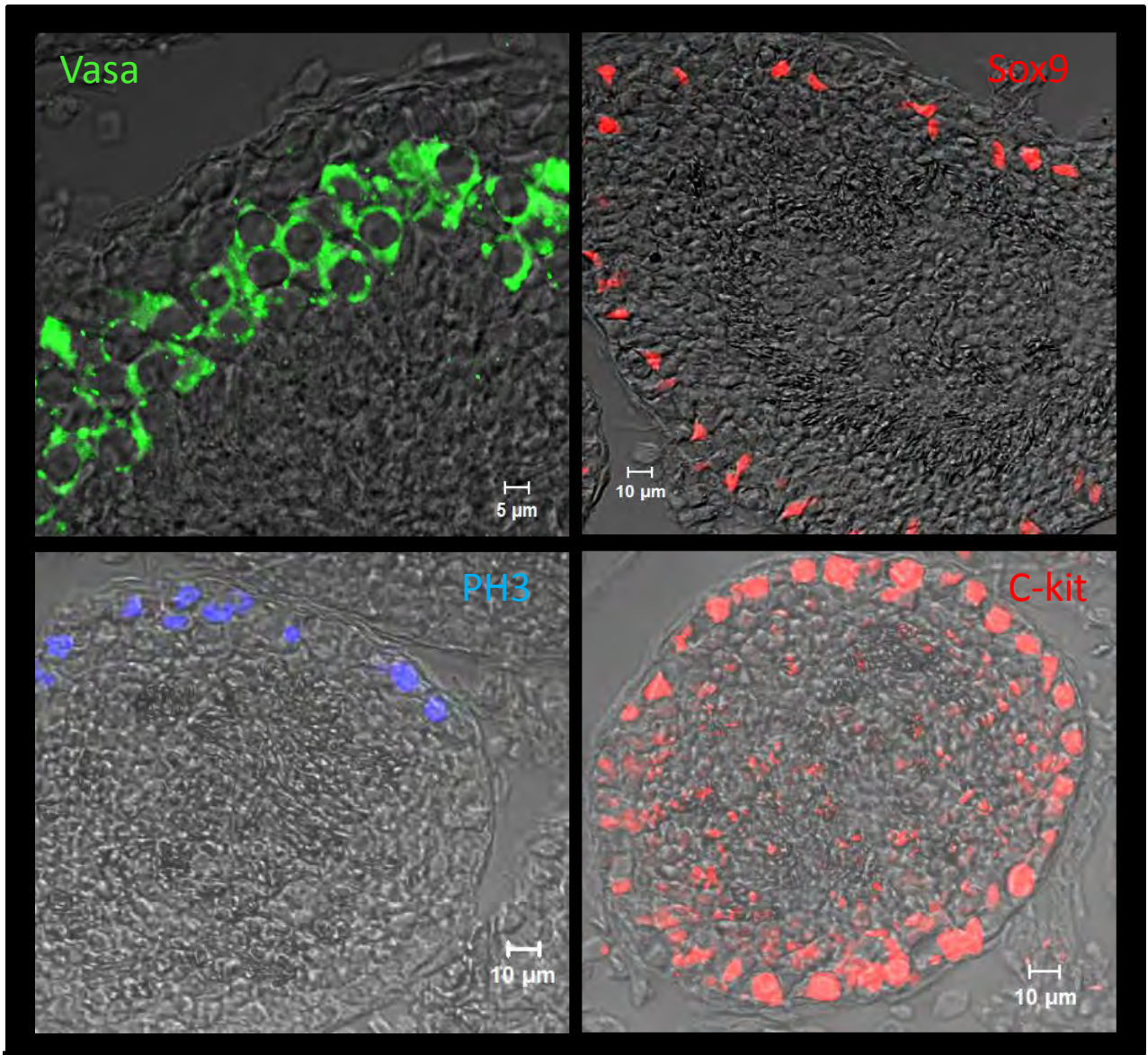


Figura 28. Detección de Vasa en citoplasma y C-kit en núcleo de espermatogonias, Sox9 en núcleos de Sertoli, PH3 en células en división. En invierno.

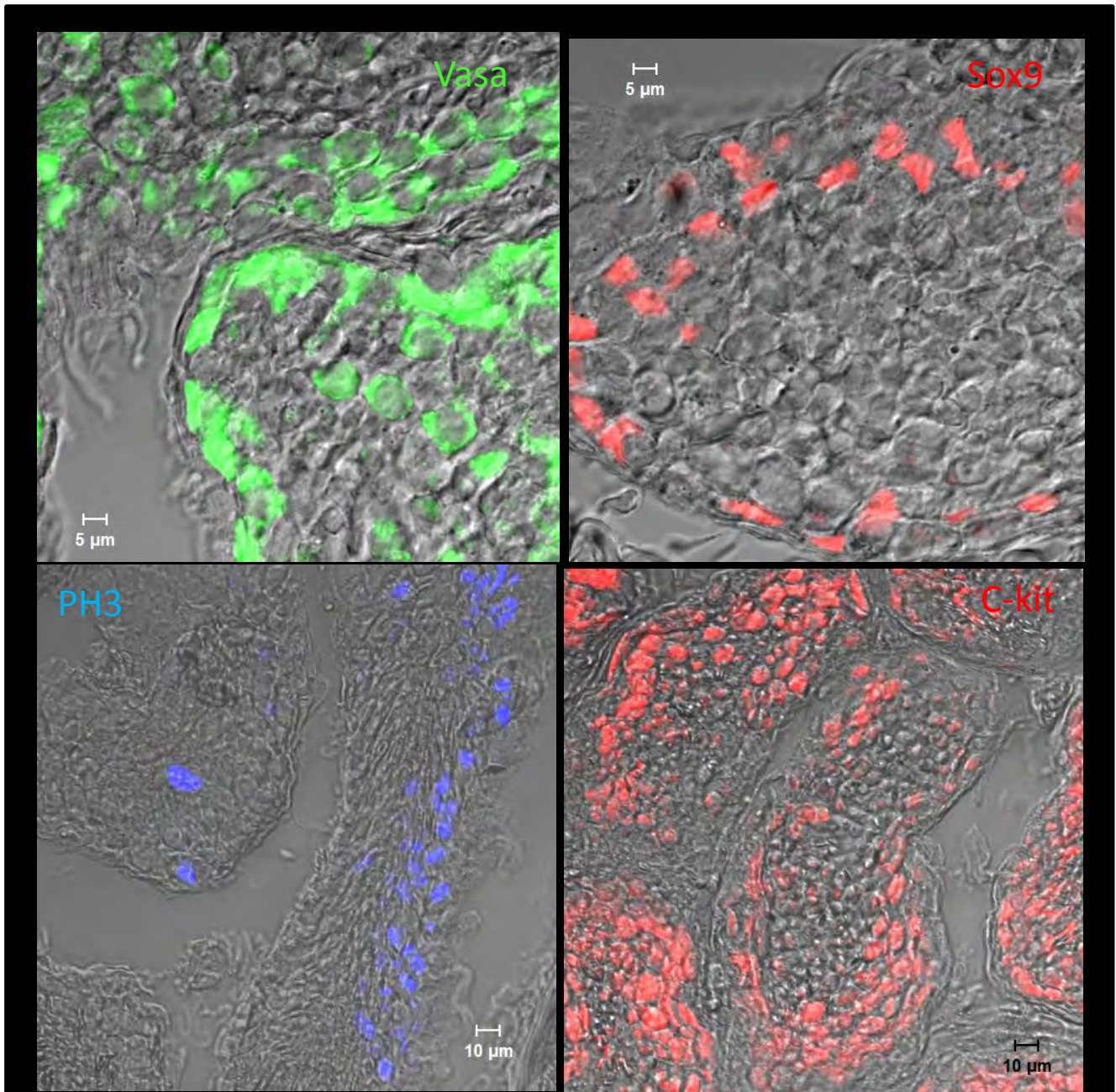


Figura 29. Detección de las proteínas Vasa en citoplasma de espermatogonias , Sox9 en núcleos de Sertoli, PH3 en espermatogonias en división y C-kit en núcleos de espermatogonias. En la estación de primavera.

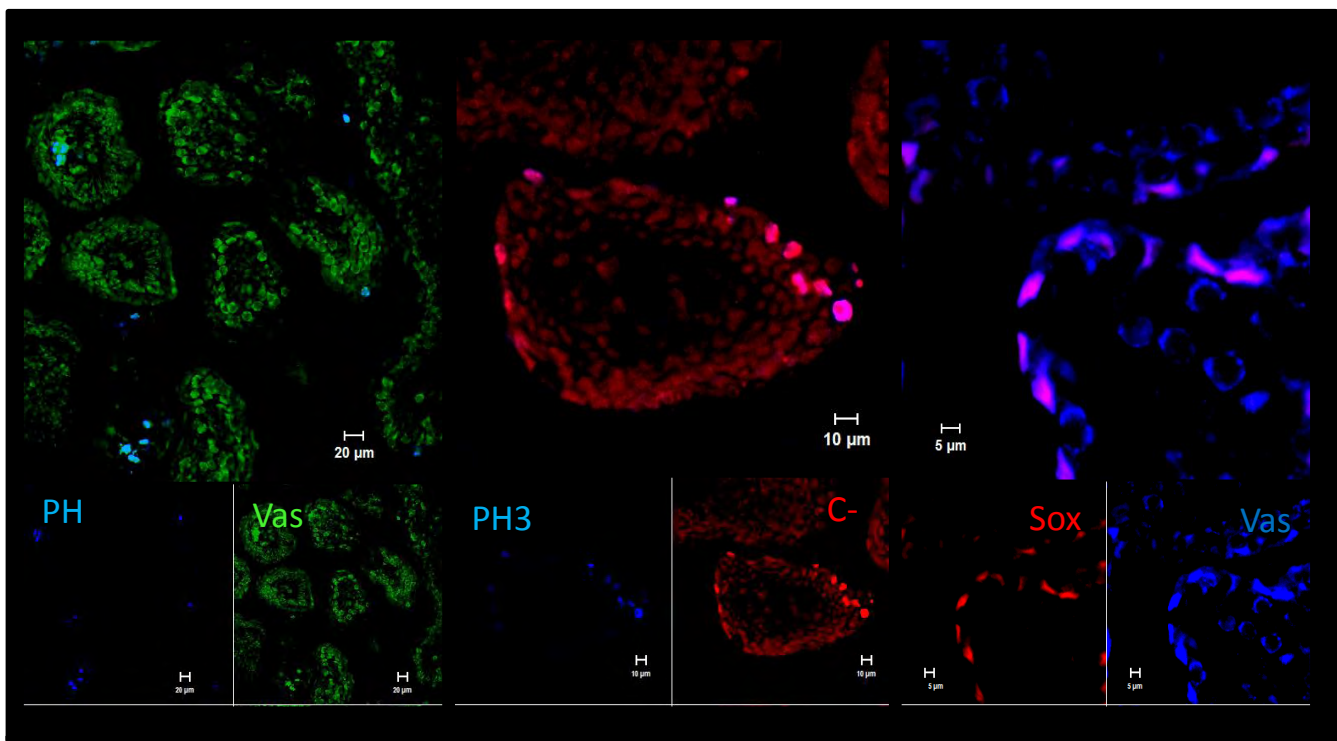
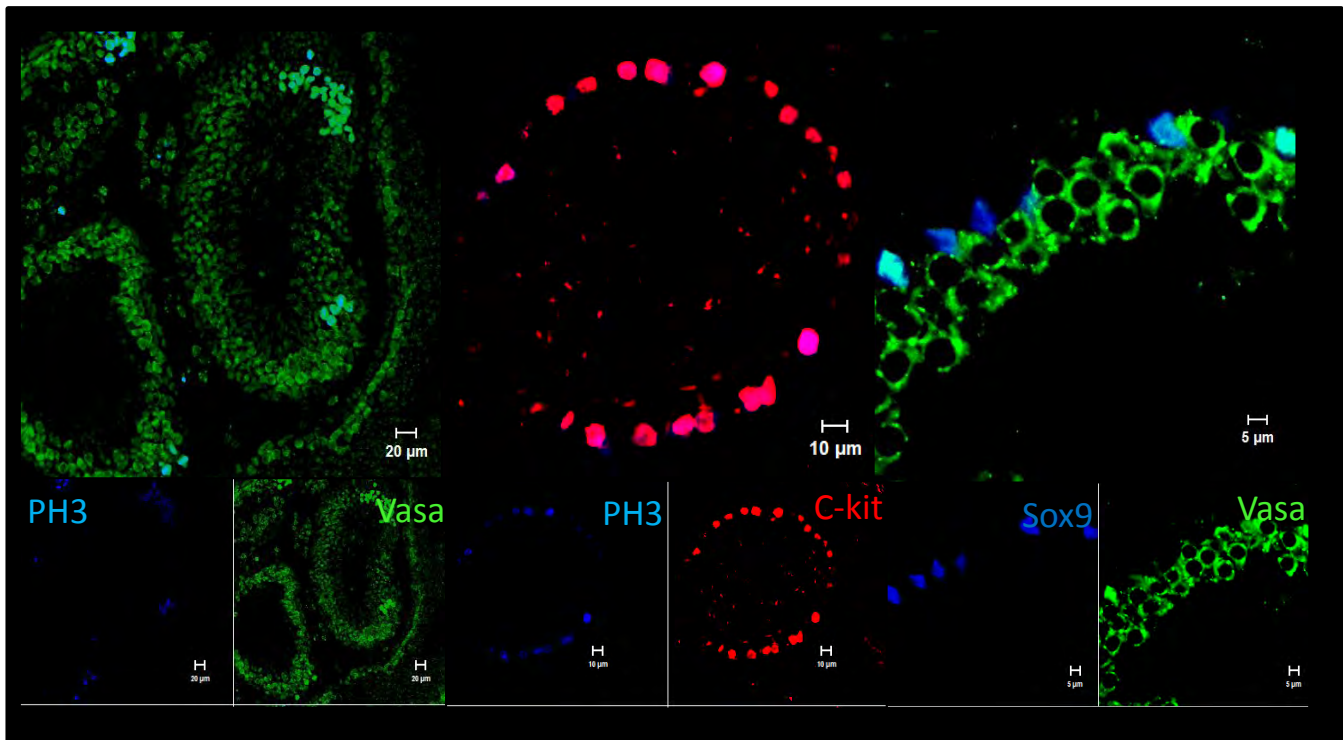


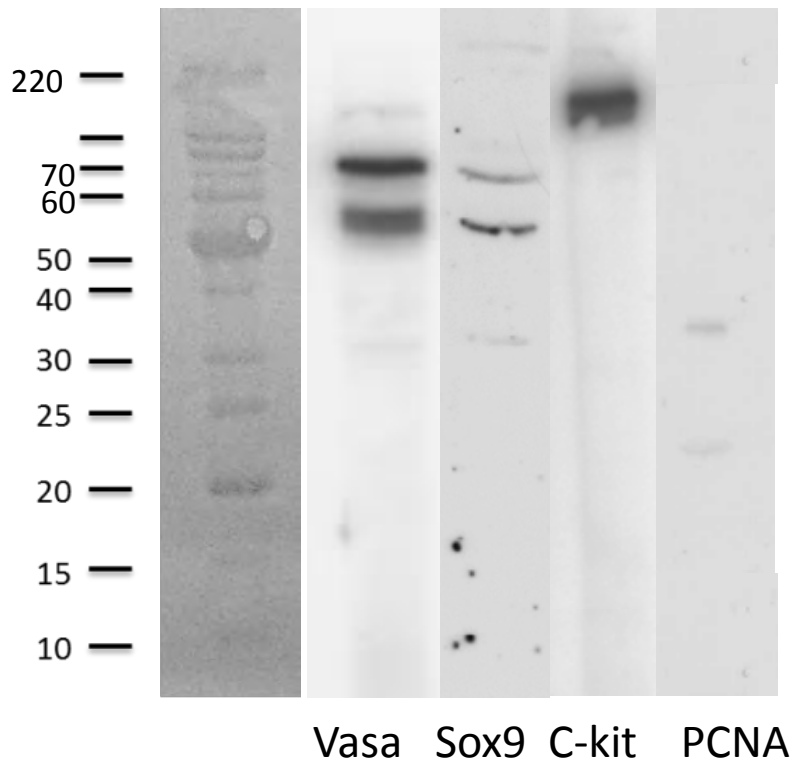
Figura 30. inmunofluorescencias dobles de PH3-Vasa identificando espermatogonias proliferando, PH3-Ckit nucleos de espermatogonias y Sox9-Vasa para identificar el epitelio germinal.

I. BIOLOGÍA MOLECULAR

Western blot

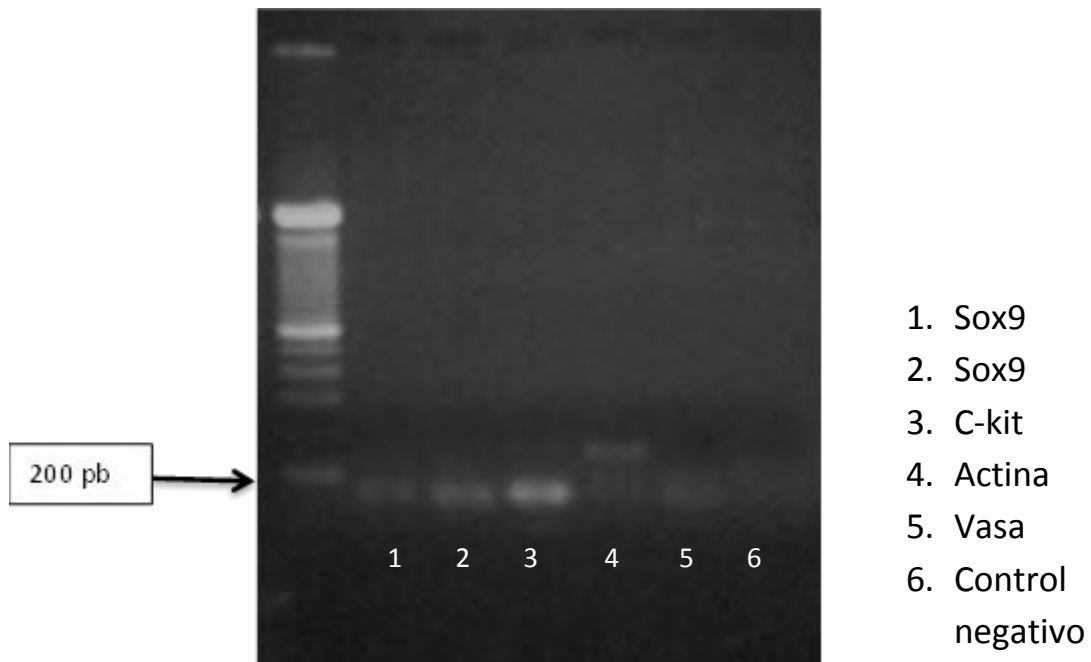
Se pudieron detectar las proteínas de SOX9 con un peso de 56 kDa, VASA de 79 kDa y CKIT de 145 kDa por medio de la técnica de western blot corroborando su expresión dentro del testículo de *Artibeus jamaicensis*.

En relación a la proteína PH3 no pudo identificarse por medio de esta técnica, pero en su lugar se utilizó PCNA como un marcador de proliferación con un peso de 36 kDa. A continuación se presenta una imagen de las bandas de proteínas detectadas.



RT-PCR

También se identificó el RNA mensajero (mRNA) de los genes descritos. Se observó una banda para *Sox9* de 126 pb, *Vasa* de 129 pb, *C-kit* de 145 pb. No analizamos *pH3* ya que es una proteína fosforilada. Al encontrar el mRNA podemos suponer que también se encuentra la proteína en dicho tejido, de manera que es otra forma de comprobar la expresión de dichas proteínas en el testículo como se observaron en las inmunofluorescencias sobre secciones. A continuación se presentan las bandas de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5%.



DISCUSIÓN

1. Características macroscópicas

En cuanto al número de ejemplares en el estudio, se esperaba tener aproximadamente la misma cantidad por estación, pero no fue posible debido a dificultades de colecta en el municipio de Yautepec, Morelos. Uno de los principales inconvenientes fue el clima, el cual impedía que los organismos salieran a alimentarse como sucedió en la estación de invierno. Otra dificultad pudo haber sido su organización social, teniendo en cuenta que se encuentran en harems, por lo que solamente las hembras salían a buscar alimento como sucedió en primavera. A pesar de ello, pudo realizarse un estudio importante del testículo de *Artibeus jamaicensis* del poblado de Yautepec, Morelos en el periodo 2012-2013.

Las medidas macroscópicas de los individuos ayudó a identificar a los ejemplares adultos de acuerdo a las siguientes medidas: longitud total 78-89 mm, longitud de antebrazo 52-67.4 mm (Smith and Starrett 1979; Swanepoel and Genoways 1979; Ortega G. Castro I. 2001), peso 45-50g (Gardner *et al.* 1991).

2. Estructura del testículo.

El testículo de *Artibeus jamaicensis* presenta una forma ovalada cubierto gran parte por el epidídimo como sucede en todos los mamíferos. En cuanto a su posición se encuentran en la base del pene, cerca de la pared abdominal ventral del cuerpo, pero no presentan una bolsa escrotal como sucede en artiodáctilos y primates (H.Ross M. 1995). Presentó una túnica albugínea vascularizada que envuelve al testículo en su totalidad, la cual ha sido bien estudiada en mamíferos como una cápsula fibrosa resistente que comprende una capa exterior de peritoneo visceral constituido por células mesoteliales, dentro de esta, una capa de fibroblastos, fibras de colágeno, fibras nerviosas mielinizadas y no mielinizadas y haces intercaladas por células de músculo liso. La longitud promedio de los testículos fue de 8.9 mm que se encuentra dentro del rango de longitud testicular descrito en *Artibeus jamaicensis* (3.5-10 mm) (Forman and Genoways 1979; Ortega G. Castro I. 2001).

En relación a la unidad funcional, el túbulo seminífero presentó la misma estructura que la descrita en mamíferos. Se encuentra constituido por un epitelio germinal conformado por espermatogonias, espermatoцитos primarios y secundarios, y por espermátidas que dan lugar a espermatozoides. Presentó un tipo de espermatogénesis radial en la cual el proceso se lleva acabo de la base al lumen del túbulo.

En relación a los tipos celulares implicados en el proceso de espermatogénesis, se identificaron espermatogonias tipo A, las cuales son las células primordiales que se

dividen mitóticamente y que dan lugar a las espermatogonias tipo B, las cuales se encuentran más diferenciadas y que al dividirse darán lugar a los espermatocitos primarios. Los espermatocitos, localizados en el compartimento adluminal, entran en un proceso meiótico y son visibles al presentar los complejos sinaptonémicos, característicos de la profase I (cigoteno), dentro del núcleo. Al finalizar la división meiótica se forman

las espermatidas, las cuales son de menor tamaño y sufren un proceso de cambios morfológicos denominado espermiogénesis. En el testículo pudieron observarse diferentes etapas de dicho proceso guiándonos por la formación del acrosoma que también fue de gran utilidad en la identificación de las etapas del ciclo del epitelio seminífero. Finalmente los espermatozoides en *Artibeus jamaicensis* presenta un acrosoma con una terminación redonda lo cual es diferente a el espermatozoide de *Platyrrhinus lineatus* que tiene una forma alargada y termina en punta, dicha comparación se hace debido a que el único trabajo realizado en una especie de la familia *Phyllostomidae* (*Platyrrhinus lineatus*) de ultraestructura del testículo por medio de microscopia electrónica de transmisión (Beguelini M. 2011).

3. Expresión de genes

▪ Sox9

En el testículo de *Artibeus jamaicensis* se detectó la proteína Sox9 en el núcleo de las células de Sertoli, las cuales juegan un papel esencial en el proceso de espermatogénesis.

Estudios anteriores han reportado que Sox9 es el factor crucial que inicia la diferenciación de las células de Sertoli y define su fenotipo. La inducción adecuada y el mantenimiento de su expresión es esencial para desarrollar un testículo completamente funcional. El modelo de regulación de Sox9 propone que la expresión de Sox9 es iniciada vía un elemento TESCO por SF1 a los 10.5 días post coitum (dpc), a los 11.5 dpc aumenta por la actividad del gen Sry (gen vinculado al cromosoma Y) y es mantenida vía dos señalizaciones positivas, un mecanismo celular intrínseco de Sox9 junto con SF-1, y un mecanismo celular extrínseco involucrando FGF9 (factor de crecimiento fibroblástico 9) y FGFR2 (FGF receptor 2) (Jacob S. Lovell R. 2011).

En mamíferos se ha reportado que ésta proteína se localiza en el citoplasma de células somáticas de soporte en gónadas XX y XY a bajos niveles previo a la expresión de Sry. Posteriormente sufre un cambio en su localización subcelular, es decir, es traslocada al núcleo de las células de Sertoli en la gónada XY, donde es detectada hasta en la etapa adulta (Morais da Silva et al., 1996; De Santa Bárbara et al., 2000). La translocación del núcleo de la proteína Sox9 es un evento clave en el inicio del proceso de diferenciación

de las células de Sertoli y de los cordones testiculares (Gasca et al., 2002; Malki et al., 2005). Estudios de expresión de Sox9, por medio de la detección de mRNA y de proteína confirman que la expresión de Sox9 continua en la parte somática en testículo fetal, postnatal y en la vida adulta (Kent et al., 1996). Estas observaciones concuerdan con los fetos humanos y adultos, consistentes con un papel continuo en el testículo (Wagner et al., 1994).

En *Artibeus jamaicensis* la proteína Sox9 se expresó en el núcleo de las células de Sertoli, lo cual puede estar muy relacionado a su funcionalidad en la espermatogénesis, siendo un indicador de que la célula se encuentra activa para la secreción de proteínas fundamentales en la nutrición de las células germinales, así como el control hormonal del proceso. Mediante RT-PCR se identificó la presencia del mRNA con la detección de una banda de 126 pb la cual podría corresponder al gen Sox9. Por medio de western blot se localizó la proteína en el testículo al observar una banda de 56 kDa.

▪ Vasa

El gen vasa codifica para una helicasa de RNA de la familia de proteínas de la caja DEAD (Lasko and Ashburner, 1988; Hay et al., 1990). La expresión específica de Vasa en la línea germinal esta conservada evolutivamente en vertebrados e invertebrados (Raz, 2000). En ratón, la proteína de MVH (mouse vasa homolog) está restringida exclusivamente a las CGPs durante la embriogénesis y gametogénesis en ambos sexos (Toyooka T. 2000). La función principal de Vasa es el mantenimiento del linaje germinal, por tal motivo, se expresa desde etapas muy tempranas del desarrollo hasta la vida adulta. Debido a su secuencia de caja DEAD, se sugiere que su función en la determinación de las células germinales está relacionada con su habilidad para unir y desenrollar el RNA (Liang et al., 1994; Yoon et al., 1997). En vertebrados, otra posible función de Vasa puede ser su unión a RNAs requeridos para la determinación de las células germinales así como el control de su traducción (Yoon et al., 1997)

En secciones de testículo de ratón se muestra por inmunofluorescencia, la proteína MVH específicamente expresada en espermatogonias y espermatidas redondas con una expresión más fuerte en etapas de espermatocitos tempranos (Toyooka T. 2000). En el caso del testículo de *Artibeus jamaicensis* se detectó por medio de Inmunofluorescencia la proteína en el citoplasma de espermatogonias, aunque aún no estamos seguros de que también estén marcando espermatocitos y espermatidas redondas, para comprobarlo es necesario utilizar un anticuerpo específico de meiosis como SCP3 (proteína 3 del complejo sinaptonémico) para comprobar que se está detectando en espermatocitos y a partir de ahí saber si también hay en espermatidas de acuerdo a su disposición en el epitelio germinal.

La espermatogénesis en ratones deficientes de Mvh se bloquea en la etapa de premeiótica de leptoteno a cigoteno. Esto sugiere que Mvh juega un papel importante en

la progresión normal de la profase meiótica que conduce a la aparición del reordenamiento cromosómico para la división meiótica. Se observa una alta expresión de ésta proteína en el citoplasma de los espermatocitos tempranos y subsecuentemente, se localiza dentro de los cuerpos cromatoides en espermatidas postmeióticas en testículos normales. (Toyooka et al. 2000; Tanaka S. 2000).

En relación a las pruebas de western blot se pudo localizar la proteína de vasa de un peso de 79 kDa. En cuanto a los transcritos se pudo comprobar la presencia de su mRNA mediante oligos creados en ratón (*Mus musculus*) presentando una banda de 129 pb.

▪ C-kit

. C-kit es un proto-oncogen que codifica un receptor tirosina cinasa (transmembranal) miembro PDGF de la familia de receptores CSF-1 (Yarden *et al.* 1987; Qiu *et al.* 1988), caracterizado como un factor específico de células totipotenciales. Dicho gen se expresa predominantemente en células germinales del testículo (Manova et al., 1990) siendo esencial en el proceso de migración de las células germinales, así como su proliferación y supervivencia en roedores (Manova et al., 1990; Godin et al., 1991; Pesce et al., 1993). Recientes estudios con hibridación *in situ* demostraron que el RNA mensajero de c-kit esta detectado, no solo en las células germinales primordiales de gónadas fetales (Orr-Urtreger *et al.* 1990) sino también en ovocitos o espermatogonias de gónadas postnatales (Manova *et al.* 1990).

Se estudió la expresión de la proteína C-kit en el testículo de *Artibeus jamaicensis* por medio de Inmunofluorescencia. Se detectó en el núcleo de espermatogonias, siendo este el tipo celular menos diferenciado. En cuanto a las pruebas de biología molecular, pudo detectarse el transcrito con una banda de 145 pb, lo que infiere la presencia del mRNA de C-kit. También se detectó por western blot la presencia de la proteína de un peso de 145 kDa en el testículo de *A. jamaicensis*.

C-kit pudo observarse en machos adultos ya que puede funcionar en la gametogénesis en relación a la proliferación espermatogonial, supervivencia y adhesión a células de Sertoli (Loveland and Schlatt, 1997). En el testículo, el factor stem cell (steel) ligando para el receptor c-kit es expresado por las células germinales (Huleihel et al., 2007; Plotton et al., 2005), la señal de SCF/c-kit estimulan la proliferación de espermatogonias (Rossi et al., 1993). Por otra parte, este gen parece a jugar un papel en la regulación de las etapas tardías de espermatogénesis (Vincent et al., 1998; Yan et al., 2000) y en la reducción de apoptosis de las células germinales (Yan et al., 2000; Tu et al., 2007).

▪ Phospho-H3

Histona 3 es una de las proteínas más altamente conservadas evolutivamente, presenta una construcción de octámeros con aproximadamente 147 pares de bases de DNA genómico formando la unidad básica de la cromatina (el nucleosoma) esencial en la condensación del DNA para el proceso de división. Las colas de N-terminal de las histonas, así como los dominios globulares están sujetos a una gran variedad de modificaciones post-traduccionales covalentes reversibles (PTMs), tales como acetilación, metilación, fosforilación y ADP-ribosilación (Sawicha A. 2012).

Se observó la expresión de PH3 en el testículo de *Artibeus jamaicensis*, como indicador importante de proliferación dentro del testículo ya que se ha demostrado una asociación estrecha entre la fosforilación de la histona 3 con la condensación de los cromosomas mitóticos en células de mamífero (Gurley L. 1978; Gurley L. 1974; Sawicha A. 2012). Sin embargo, esta correlación ha sido observada durante la mitosis y meiosis en un gran rango de eucariotas, la significancia funcional de esta modificación a sitios individuales de H3 difiere entre especies (Giet D. 2001; Hsu J. 2000; Kaszas W. 2000; Van Hooser A. 1998; Wei Y. *et al.* 1998; Wei Y. *et al.* 1999). La fosforilación de H3 en células mitóticas de mamíferos ocurre masivamente en varios residuos, incluyendo serina 10 y 28, así como treoninas 3 y 11 y exhibe una distribución espacio-temporal altamente coordinada (Bonenfant D. 2007; Garcia B. 2005; Zhou H. 2008)

Debido a que no pudimos detectar a la H3 fosforilada por WB, decidimos utilizar otro marcador de proliferación. Para corroborar que el testículo se encuentra activo, usamos la proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). PCNA se encuentra en el núcleo y es un cofactor de la ADN polimerasa delta. La proteína es sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular y ayuda a incrementar la capacidad de procesamiento de síntesis de la cadena durante la replicación del DNA. En respuesta al daño del ADN, esta proteína es ubiquitinada y está implicado en la vía de reparación DNA dependiente de RAD6 (Matsumoto K. 1987; NCBI, 2013). Mediante WB se detectó una banda de 36 kDa que concuerda con el peso de la proteína.

4. Estacionalidad

En el estudio del testículo de *Artibeus jamaicensis* a lo largo del año se pudo observar mediante la histología que no hubo cambios importantes en la morfología testicular durante las estaciones de primavera, verano e invierno. Sin embargo, en otoño, a diferencia de las otras estaciones, los testículos presentaron túbulos seminíferos con una luz muy pequeña o en algunos casos ausente sin producción de espermatozoides. En menor cantidad se observaron túbulos abiertos con gametos masculinos, reconociendo

que en dicha estación hubo una mayor cantidad de ejemplares colectados. Estas características morfológicas de los testículos en otoño pueden deberse a la disponibilidad de alimento, ya que en dicha temporada las hojas de los árboles caducos cambian y su color verde se vuelve amarillento y amarronado, hasta que se secan y caen ayudadas por el viento que sopla con mayor fuerza y la temperatura comienza a bajar. También puede estar relacionado a la reproducción, ya que la temporada de apareamiento es en el mes de agosto, por lo que la producción de espermatozoides decrece y puede encontrarse en un proceso de transición espermatogénico.

En relación a la detección de los genes descritos por Inmunofluorescencia en las cuatro estaciones del año, cualitativamente no se observaron diferencias en cuanto a la expresión de las proteínas teniendo a Vasa como marcador de la línea germinal, Sox9 expresado en las células de Sertoli indicando la funcionalidad de dichas células, C-kit como factor de células totipotenciales marcando a las espermatogonias y finalmente PH3 como marcador de proliferación en el testículo que nos da una idea de la actividad celular dentro de los túbulos seminíferos y por ende un proceso espermatogénico favorable. En cuanto a PH3 se identificaron diferencias cualitativas con respecto a la estación en cuanto al patrón de proliferación en el testículo, debido a que en algunas secciones presentaban menos células marcadas, mientras que en otros la marca era predominante en toda el área analizada. Hasta que se realice una cuantificación de expresión por medio de una técnica de biología molecular, se podrá hablar con seguridad de las diferencias en las estaciones.

Se observó cualitativamente que en las cuatro estaciones del año hubo producción de espermatozoides en mayor o menor medida, lo que sugiere que los individuos de *Artibeus jamaicensis* tienen una reproducción continua y que no presentan ningún periodo de regresión testicular como en *Artibeus lituratus* (Oliveira. 2009; Duarte y Talamoni, 2009). Por lo que esta especie se incluye entre los muchos murciélagos filostómidos que son poliestricos bimodales en los que la reproducción es continua en los machos pero solo se dan dos eventos de apareamiento relacionados al ciclo reproductivo de la hembra (Crichton E. and Krutzsch P. 2000).

Los murciélagos muestran un rango de patrones anuales de reproducción, que varían en ambos periodos del año en el cual la gestación ocurre, y su espacio, en relación a ciclos climáticos anuales y estacionales, así como el grado de sincronía de eventos reproductivos dentro de la población (Jerrett, 1979; Tuttle and Stevenson, 1982; Crichton E. and Krutzsch P. 2000). Estudios recientes sugieren que mucha de la variación en ambos, sincronización y patrones de reproducción pueden estar determinados por el grado de estacionalidad climática, y el patrón reproductivo de especies individuales varía a través del rango geográfico (Happold and Happold, 1990), por lo que pueden existir diferencias en cuanto a los lugares en los que los individuos sean colectados. En zonas

tropicales se presentan tres principales patrones identificados por Jerrett (1979): monoestría estacional, poliestría estacional y poliestría no estacional. Entre ellas es importante remarcar que la especie *Artibeus jamaicensis* es del tipo de poliestria bimodal estacional con estro postparto en el que las hembras tienen dos camadas por año en sincronía, con los dos periodos de nacimientos vinculados a las estaciones climáticas particulares; el primer nacimiento está estrechamente seguido por un estro postparto y después de eso las hembras simultáneamente quedan gestantes y lactando. Hay un periodo de no actividad reproductiva seguida del segundo nacimiento. (Fleming, 1971;.Racey P ; Entwistle A. 1998).

CONCLUSIONES

- ❖ Los individuos de *Artibeus jamaicensis* presentaron una altura promedio de 8.58 cm y un peso de 43.71 g lo cual los convierte en individuos adultos perfectos para el estudio.
- ❖ Por medio de microscopia de campo claro y microscopia electrónica de transmisión se pudieron identificar todos los tipos celulares implicados en el proceso de espermatogénesis, teniendo un linaje somático (células de Sertoli, células de Leydig y mioides) y un linaje germinal (espermatogonias, espermaticitos, espermátidas y espermatozoides).
- ❖ El testículo de *A. jamaicensis* presentó una estructura similar a la de todos los mamíferos con un tipo de espermatogénesis radial que comienza de la lámina basal al lumen donde son liberados los espermatozoides. Se detectaron nueve etapas del ciclo del epitelio seminífero de acuerdo al sistema acrosómico de Clermont Y, 1972.
- ❖ La detección de las proteínas Vasa y C-kit en espermatogonias, Sox9 en células de Sertoli y PH3 en espermatogonias proliferando fue útil para reconocer los tipos celulares en el testículo y observar su actividad. A lo largo del año se expresaron dichas proteínas mostrando una actividad continua en los machos de *Artibeus jamaicensis*.
- ❖ Los machos colectados en la comunidad de Yautepec, Morelos tienen una reproducción continua a lo largo del año ya que tienen una producción consecutiva de espermatozoides sin observarse periodos de regresión testicular en alguna de las estaciones.

BIBLIOGRAFIA

- Amann, R.P., 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Van Demark, N.L. (Eds.), *The Testis*, vol. I. Academic Press Inc., New York, NY, pp. 433–482.
- Baker R. J. 1967. Karyotypes of bats of the family Phyllostomidae and their taxonomic implications. *The Southwestern Naturalist* 12:407–428.
- Barlow J. and Tamsitt J. 1968. Twinning in American leaf-nosed bats (*Chiroptera: Phyllostomidae*). *Canadian Journal of Zoology* 46:290–292.
- Batias C.Defamie N. Lablack A. Thepot D. Fenichel P. Segretain D. Points G.1999. Connexin 43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* 48 (6) 793-805.
- Batias C.Defamie N. Lablack A. Thepot D. Fenichel P. Segretain D. Points G.1999. Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res.* 298 (1), 113-121.
- Beguelini M. Puga C. Taboga S. Morielle E. (2011). "Ultrastructure of spermatogenesis in the White-lines broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (*Chiroptera: Phyllostomidae*).*Journal Micron* 42.
- Beguelini M. Moreira P. Faria K. Marchesin S. Morielle E. 2009.Morphological characterization of the testicular cells and seminiferous epithelium cycle in six species of Neotropical bats. *J Morphol.* (8):943-53.
- Bellve, A.R., Zheng,W., 1989. Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J. Reprod. Fertil.* 85, 771–793.
- Berndston W.E.and Desjardins C. The Cycle of the Seminiferous Epithelium and Spermatogenesis in the Bovine Testis. *AM. J. ANAT.*, 140: 167-180.
- Bonenfant D. Towbin H. Coulot P. Schindler D. Mueller J. Van Oostrum. 2007. Analysis of dynamic changes in post-translational modifications of human histones during cell cycle by mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 6; 1917-1932
- Brown, R.E., Genoways, H.H. and Jones, J.K., Jr (1971). Bacula of some neotropical bats. *Mammalia* 35, 456–464.
- Buch, J.P., Lamb, D.J., Lipshultz, L.I., Smith, R.G., 1988. Partial characterization of a unique growth factor secreted by human Sertoli cells. *Fertil. Steril.* 49, 658–665.
- Cameron F. Sinclair A. 1997. Mutations in Sry and Sox9: Testis-Determining Genes.*Human Mutation* 9:388-395.
- Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, and Crum CP. 2000. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9585–9590.

- De Santa Barbara P. Bonneaud N. Boizet B. Desclozeaux M. Moniot B. Sudbeck P. Scherer G. Poulat F & Berta P. 1998. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18, 6653–6665.
- Eisenberg, J. F. 1989. *Mammals of the Neotropics, the northern Neotropics*. The University of Chicago Press, Illinois 1:1–449.
- Chocu S. Cavel P. Rolland A. Pineau C. 2012. Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2012, 58: 179–190.
- Crichton E. Krutzsch. 2000. *Reproductive Biology of Bats*. First edition. Academic Press A Harcourt Science and Technology Company. San Diego, California. p.510.
- Dym, M., Raj, H.G.M., 1977. Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. *Biol. Reprod.* 17, 676–696.
- Entwistle, A.C., Racey, P.A. and Speakman, J.R. (1998). The reproductive cycle and determination of sexual maturity in male brown long-eared bats, *Plecotus auritus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Zoology, London* 244, 63–70.
- Forman G L. H Genoways. (1979). Sperm morphology in Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. The Museum, Texas Tech University Press 16:1–441.
- Feig, L.A., Bellve, A.R., Erickson, N.H., Klagsbrun, M., 1980. Sertoli cells contain a mitogenic polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4774–4778.
- Fleming T H. (1971). *Artibeus jamaicensis*: delayed embryonic development in a neotropical bat. *Science* 171:401–404.
- Fleming T H. E T Hooper. D E Wilson. (1972). Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles, and movement patterns. *Ecology* 53:555–569
- Forman G L. H Genoways. (1979). Sperm morphology in Biology of the bats of the New World family *Phyllostomatidae*. The Museum, Texas Tech University Press 16:1–441.
- Fritz I.B. 1993. Secretion of proteases and inhibitors. In “The Sertoli Cell”(M.D.Griswold and L.D.Russell, eds). Cache River Press, Clearwater, FL
- Garcia B. Barber C. Hake S. Ptak C. Turner F. Busby S. Shabanowitz J. Moran R. Allis C. Hunt D. 2005. Modifications of human histone H3 variants during mitosis. *Biochemistry* 44; 13202-13213.
- Gardner A. 1977. Feeding habits. Pp. 293–350 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*. Part II (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 13: 1–364.
- Gardner A. Handley J. Wilson D. 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.

- Gasca S. Cazineros J. De Santa Barbara P. Mejean C. Poulat F. Berta P. Boizet-Bonhoure. 2002. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(17):11199-1807.
- Geneser F. 1993. *Histología*. Segunda edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. P. 768.
- Giet D. Glover D. 2001. *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensing recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol*, 152; 669-682.
- Gilbert S. 2006. *Developmental Biology*. Eighth edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 817 p.
- Godin I. Deed R. Cooke J. et al. 1991. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 352; 807-809.
- Gow A. Southwood C. Li J. Pariali M. Riordan G. Brodie S. Danias J. Bronstein J. Kachar B. Lazzarini R. 1999. CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell Issue Res.* 298(1), 113.121.
- Greenhall A. 1956. The food of some Trinidad fruit bats (*Artibeus and Carollia*). *Journal of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago*, Supplement 56:424-447.
- Griswold M. D. 1993. Protein secretion by Sertoli cells: general considerations. In "The Sertoli Cell" (M.D. Griswold and L.D. Russell, eds). Cache River Press, Clearwater, FL. pp 195-200.
- Griswold M. D. 1998. Protein secretion of Sertoli Cells. *Int Rev. Cytol.* 110, 133-156.
- Griswold M. D. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev. Biol.* 9 (4), 411-416.
- Grimaldi P. Rossi P. Dolci S. Ripamonti C. Geremia R. 2002. Molecular genetics of male infertility; stem cell factor/c-kit system. *Am. J. Reproduction. Immunol.* 48(1), 27-33.
- Grimaldi P. Capolunghe F. Geremia R. Rossi P. 2003. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) stimulation of the kit ligand promoter in Sertoli cells requires an Sp1-binding region, a canonical TATA box, and a cAMP-induced factor binding to an immediately downstream GC-rich element. *Biol. Reprod.* 69(6), 1979-1988.
- Goodfellow PN and Lovell-Badge R. 1993. SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27:71-92
- Gutenbach M. Martinez E. Engel M. Schmid M. 1996. Interphase chromosome arrangement in Sertoli cells of adult mice. *Biol. Reprod.* 54; 980-986.
- Gurley L. Walters R. Tobey R. Cell cycle-specific changes in histone phosphorylation associated with cell proliferation and chromosome condensation. *J. Cell Biol.* 60; 356-364.
- Gurley L. D'Anna J. Barham S. Deaven L. Tobey R. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur. J. Biochem.* 84;1-15.

- Gurley L. D'Anna J. Barham L. Deaven R. Tobey R. 1997. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamsters cells. *Eur.J.Biochem.* 84;1-15.
- Guraya S. 1995. The comparative Cell Biology of Accessory Somatic (or Sertoli) Cells in the animal testis. *International Review of Cytology.* 160; 163-220.
- Hall E R. Dalquest W. (1963). The mammals of Veracruz. University of Kansas Publications, Museum of Natural History 14:165–362.
- Handley C. Morrison D. 1991. Foraging behavior. Pp. 137–140 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.
- Happold, D.C.D. and Happold, M. (1990a). Reproductive strategies of bats from Africa. *Journal of Zoology, London* 222, 557–583.
- Happold, D.C.D. and Happold, M. (1990b). The domiciles, reproduction, social organization and sex ratios of the banana bat *Pipistrellus nanus* (Chiroptera, Vespertilionidae) in Malawi, Central Africa. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 55, 145–160.
- Hauet T, Liu J, Li H, Gazouli M, Culty M, Papadopoulos V. 2002. PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells. *Endocr Res.* (4):395-401.
- Hay, B., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1990. Localization of vasa, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development* 109, 425±433.
- Heckert L. and Griswold M. 2002. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 129-148.
- Henzel M. Wei M, Mancini A. Van Hooser A. Ranalli T. Brinkley D. Bazett D. Allis C. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106; 348-360.
- Hettle, J.A., Balekjian, E., Tung, P.S and Fritz (1988) Testicular peritubular two plasminogen activators and an antiactivator each regulated differently cells in culture secrete an inhibitor of plasminogen activator activity. *Biol. by gonadotropin.* *Endocrinology*, 116, 1666–1668.
- Hess R. Franca L. 2005. Structure of the Sertoli Cell. In: Skinner M. Griswold M. *Sertoli Cell Biology.* San Diego Californis, USA. *Reprod.*, 38, 359–371.
- Hood C. Smith J. 1983. Histomorphology of the female reproductive tract in phyllostomid bats. *Occasional Papers, The Museum Texas Tech University* 86:1–38.
- Hsu J. Sun Z. Reuben M. Tatchell K. Bishop D. Grushcow J. Brame C. Caldwell J. Hunt D. Lin R. Smith M. Allis C. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphate in budding yeast and nematodes. *Cell* 102;279-291.
- Jakob S. and Lovell-Badge R. 2011. Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. *FEBS Journal* 278; 1002–1009.

- Jerrett, D.P. 1979. Female reproductive patterns in nonhibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility* 56, 369–378.
- Johnson, L., 1991b. Spermatogenesis. In: Cupps, P.T. (Ed.), *Reproduction in Domestic Animals*, fourth ed. Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 173–219- Jutte, N.H., Jansen, R., Grootegoed, J.A., Rommerts, F.F., Clausen, O.P., van der Molen, H.J., 1982. Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J. Reprod. Fertil.* 65, 431–438.
- Johnson L. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*105 (23-51)
- Jones J. Chiata J. Cadena A. 1972. Mammals from the Mexican state of Sinaloa. II. Chiroptera. *Occasional Papers, Museum of Natural History, University of Kansas* 6: 1–29.
- Jones J. Smith J. Genoways H. 1973. Annotated checklist of mammals of the Yucatan peninsula, Mexico. I. Chiroptera. *Occasional Papers, The Museum, Texas Tech University* 13:1–31.
- Jones J K, Carter JR, 1976. Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*. Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 10:1–218
- Jutte, N.H., Jansen, R., Grootegoed, J.A., Rommerts, F.F., van der Molen, H.J., 1983. FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 68, 219–226.
- Kaszas E. Cande W. 2000. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J. Cell Sci.* 113;3217-3226.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH & Koopman P. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122, 2813–2822
- Kumar T. Wang Y. Lu N. ,atzuk M. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.*15(2) 201-204.
- Kunz TH. August PV. Burnett CD. (1983). Harem social organization in cave roosting *Artibeus jamaicensis*. *Biotropica*.15:133-138-KUNZ, T. H., AND G. F. MCCRACKEN. 1995. Tents and harems: apparent defense of foliage roost by tent-making bats. *Journal of Tropical Ecology* 11:1–17.
- Kunz T. Díaz C. 1995. Folivory in fruit-eaten bat with new evidence from *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Biotropica* 27:106–120.
- Kushida T. Iijima H. Nagato Y. Kushida H. 1993. Studies on thick sections of the nucleus of mouse Sertoli cells using an electron microscope operating at 300 kV. *Anat.Jpn.* 70;41-50.
- Lasko, P.F., Ashburner, M., 1988. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335, 611-617.
- Leblond C. Clermont Y. 1952. Definition of stages of the cycle of seminiferous epithelium in the rat. *Annals New York Academy of Sciences.* 55(4):548-73.

- Liang L. Diehl-jones W. Lasko P. 1994. *Development* (Cambridge U.K.)120, 2001-1211.
- Lin, W.W., Lamb, D.J., Wheeler, T.M. et al. 1997. *in situ* end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril.*, 68, 1065–1069.
- Loveland K. Schlatt S. 1977. Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis : lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *J. Endocrinol* 153; 337-344.
- Lukas C. et al. 2003. Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-Mullerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5' monophosphate-mediated activation of the AMH gene. *Mol. Endocrinol.* 17(4), 550-561.
- Luger K. Mader R. Richmond D. Sargent D. Richmond T. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389; 251-260.
- Maekawa M, Kamimura K, Nagano T.1996. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol.* 59(1):1-13.
- Malki S. Berta P. Poulat F. Boizet-Bonhoure. 2005. Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res* 309(2):468-475.
- Manova K. Nocka K. Besmer P. Bachvarova R. 1990. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 110, 1057-1069.
- Mares M. Ojeda R. Kosco M. 1981. Observations on the distribution and ecology of the mammals of Salta province, Argentina. *Annals of Carnegie Museum* 50:151–206.
- Marzially G. Lazzaro D. Sorrentino V. 1993. Binding of germ cells to mutant Sld Sertoli cells is defective and is rescued by expression of the transmembrane form of the c-kit ligand. *Dev. Biol.* 157(1), 182-190.
- Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK (1987). Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *EMBO J.* 6 (3): 637–42. [PMID 2884104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2884104/).
- McGinley D. et al. 1979. Gap junctions between Sertoli and germ cells of rat seminiferous tubules. *Tissue Cell* 11;741-754.
- Medellin RA. Arita HT. Sánchez O. (2008). Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. 2da. Edición. Instituto de Ecología. UNAM. Pp. 79.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A & Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14, 62–68.
- Moreno N. (2009). Migration and differentiation of primordial germ cells in *Sturnira lilium* and *Artibeus jamaicensis*. *Developmental Biology* 331: 418–419.
- Morrison P. McNab B. 1967. Temperature regulation in some Brazilian phyllostomid bats. *Comparative Biochemistry and Physiology* 21:207–221.

- Morrison D. 1979. Apparent male defense of tree hollows in the fruit bat, *Artibeus jamaicensis*. *Journal of Mammalogy* 60: 11–15.
- Morrison D. Handley J. 1991. Roosting behavior. Pp. 131–136 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.
- Myers P. Wezel 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.
- NCBI. 2013. PCNA proliferating cell nuclear antigen [*Homo sapiens* (human)] . Gene ID: 5111, updated on 14-Dec-2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5111>
- Nocka K. Majumder S. Chabot B. Ray P. Cervone M. Bernstein A. Besmer P. (1989). Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice-evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes and Dev* 3, 816-826.
- Olive V. Cuzin. (2004).The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37:246-250.
- Oliveira L. Oliveira G. Mahecha G. Nogueira J. Oliveira C. (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. *General and Comparative Endocrinology* 161: 283–292
- Orr-Urtreger A. Avivi A. Zimmer Y. Givol D. Yarden Y. and Lonai P. 1990. Developmental expression of c-kit, a protooncogene encoded by the W locus. *Development* 109; 911-923.
- Ortega G. Castro I. 2001. *Artibeus jamaicensis*. *Mammalian Species*. 662;1-9.
- Paulson, J. R. and Taylor, S. S. (1982). Phosphorylation of histones 1 and 3 and non histone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *J. Biol. Chem.* 257, 6064-6072.
- Pesce M. Farrace M. Piacentini M. et al. 1993. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 118; 1089-1094.
- Plotton I, Sanchez P, Perrard MH, Durand P and Lejeune H (2005) Quantification of stem cell factor mRNA levels in the rat testis: usefulness of clusterin mRNA as a marker of the amount of mRNA of Sertoli cell origin in post pubertal rats. *J Endocrinol* 186(1),131–143.
- Qiu, F., Ray P. Brown K. Barker P. Jhanwar S. Ruddle F. Besmer P. 1988. Primary structure of the c-kit; relationship with the CSF-I/PDGF receptor kinase family oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J.* 7, 1003-1011.
- Racey, P.A. (1982). Ecology of bat reproduction. In *Ecology of Bats* (T.H.Kunz, ed.). Plenum Press, New York.
- Raz E. 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biology*. 1(3):reviews1017.1–1017.6.

- Redford K. Einsenberg J. 1992. Mammals of the Neotropics. The southern cone. The University of Chicago Press, Illinois 2:1–430.
- Risley M. 2000. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol.Reprod.* 62(3), 748-754).
- Robinson L. Gaskell T. Saunders P. Anderson R. 2001. Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. *Molecular Human Reproduction* Vol 7; 845-852.
- Romero M. Aguilar A. Sanchez C. 2005. Murcielagos benéficos y vampiros : características, importancia, rabia, control y conservación. México, D.F. : AGT Editor Editor : IMSS. 213 páginas.
- Rossi P. Albanesi C. Grimaldi P. Geremia R. 1991. Expression of the mRNA for the ligand of c-kit in mouse Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Immunol.* 176(2), 910-914.
- Ross M. Romrell L. Gordon K. 1997. *Histología: Texto y atlas en color*. Tercera edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. P.817.
- Russell L. and Clermont Y. 1976. Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *Anat. Rec.* 185;259-278.
- Russell L. 1979. Observations on the inter-relationships of Sertoli cells at the level of the blood-testis barrier :Evidence for formation and resorption of Sertoli-Sertoli tubulobulbar complexes during spermatogenic cycle of rat. *Am.J. Anat.* 155; 259-79.
- Russell L. 1980. Sertoli-germ cell interactions:A review. *Gamete Res* 3;179-202.
- Russell L. et al. 1980. Sertoli ectoplasmic specializations during spermatogenesis. In “*Testicular Development, Structure and Function*” (A.Steinberg eds.)p.55-69.
- Russell L. 1993. Form dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells.In the “*Sertoli Cell*”p. 1-37. Cache River Press, Clearwater, F.L.
- Russell, L.D., Griswold, M.D., 1993. *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, FL.
- Sawicka A. Seiser C. 2012. Histone H3 phosphorylation-A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* 94; 2193-2201.
- Senger P.L. 2003. *Pathways to pregnancy and Parturition*. Second edition. Current Conceptions, Inc. Washington State University. 369 p.
- Skinner M.K. Griswold M.D. 2005. *Sertoli Cell Biology*. First edition. ELSEVIER Academic Press. San Diego California. P.494.
- Skinner M. Fritz I.1985. Structural characterization of proteoglycans produced by testicular peritubular cells and Sertoli cells. *J Biol Chem.* 260(21):11874-83.
- Smith J. Starret A. 1979. Morphometric analysis of Chiropteran wings. Pp. 229–317 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.

- Studier E. Wilson D. 1979. Effects of captivity on thermoregulation and metabolism in *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 62A:347–350.
- Swanepoel P. Genoways H. 1979. Morphometrics. Pp. 13–106 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.
- Tremblay et al. 2001. Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. *Mol Endocrinol.* 15(9), 1636-1650.
- Tajima Y. Onue H. Kitamura Y. Nishimune Y. 1991. Biologically active kit ligand growth factor is produced by mouse Sertoli cells and is defective in Sld mutant mice. *Development* 113(3), 1031-1035.
- Tanaka, S., Toyooka, Y., Akasu, S., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Noce, T., 2000. Mouse homolog gene to *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.*, in press.
- Timm R. 1987. Tent construction by bats of the genera *Artibeus* and *Uroderma*. Pp. 187–212 in *Studies in Neotropical mammalogy, essays in honor of Phillip Hershkovitz* (B. D. Patterson and R. M. Timm, eds.). *Fieldiana: Zoology, New Series* 39:1–506.
- Toyooka Y. Tsunekawa N. Takahashi Y. Matsui Y. Satoh M. Noce T. 2000. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development* 93: 139-149.
- Tuttle, M. and Stevenson D. 1982). *Growth and survival of bats*. In *Ecology of Bats* (T.H. Kunz, ed.). Plenum Press, New York.
- Van Hooser A. Goodrich D. Allis C. Brinkley B. Mancini M. 1998. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance of mammalian chromosome condensation. *J. Cell Sci.* 111; 3497-3506.
- Vincent S. Segretain D. Nishikawa S. et al. 1998. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis. *Development* 125, 4585-4593.
- Wagner T. Wirth J. Meyer, J. Zabel B. Held M. Zimmer J. Pasantes J. Bricarelli F. Keutel J. Hustert E. Wolf U. Tommerup N. Schempp W. Scherer G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*. *Cell* 79, 1111-1120.
- Watanabe K. et al. 2000. Endogenous expression of Mullerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cell requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4 binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4), 1624-1629.
- Wei Y. Yu J. Bowen J. Gorovsky M. Allis C. 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc. Natl Acad. Sci. United State. America* 95(13); 7480-7484.
- Wei Y. Yu L. Bowen J, Gorovsky M. Allis C. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97; 99-109.

- Wells D. McBride C. 1989. A comprehensive compilation and alignment of histones and histone genes. *Nucleic Acids Res.* 17; 311-346.
- Yan C. Wong E. Yan H. Mruk D. 2010. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium. *News insights and advances. Molecular and Cellular Endocrinology* 315;49-56.
- Yarden Y. Kuang W. Yan-Feng T. Coussens L. Munemitsu S. Dull T. Chen E. Schlessinger J. Francke U. Ullrich A. 1987. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 6, 3341-3351.
- Yoon C. Kawakami K. Hopkins N. 1997. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124, 3157± 3165.
- 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. *Development* 113; 689-699.
- Zeeman A. Stoop H. Boter M. Gillis Ad. Castrillon D. Oosterhuis J. Looijenga L. 2002. VASA Is a Specific Marker for Both Normal and Malignant Human Germ Cells. *Laboratory investigation.* 82: 159-166.
- Zhou H. Li D. Song L. Liu R. Chen J. Huang X. 2008. Thr11 phosphorylated H3 is associated with centromere DNA during mitosis in MCF-7 cells. *Mol. Cell Biochem* 311;45-50.