



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DESARROLLO EMBRIONARIO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS
PROGENITORAS DE LA LÍNEA GERMINAL EN MURCIÉLAGOS
FILOSTÓMIDOS.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
TANIA JANETH PORRAS GÓMEZ**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO
FACULTAD DE MEDICINA**

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE, 2018



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.

AGRADECIMIENTOS



Este trabajo se realizó en el laboratorio A005 del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

Tania Janeth Porras Gómez agradece al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante sus estudios de Doctorado con número de registro 290144, recibida durante el periodo 2013-1 al 2018-1.

El presente trabajo de tesis fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN205515 y No. IN204119)

Se les agradece a los miembros del jurado por su revisión y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Dra. Diana Maria Escalante Alcalde

Dra. Rosa Estela Navarro Gonzales

Dr. Karlen Gazarian Gazarian

Dr. Gabriel Gutierrez Ospina

Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano

Extiendo un agradecimiento especial a la Dra. Norma Moreno por brindarme las herramientas necesarias para la culminación de este proyecto.

A sido un inmenso placer compartir tantos años con usted y su grupo de investigación, gracias por ser mi maestra en este arte que es la ciencia, gracias por tomar mi mano y no saltarme, guiarme y darme las herramientas para continuar, enseñarme a luchar por mis ideales y ser firme en mis desiciones. Gracias por caminar conmigo a cada paso y estar a mi lado en cada tropiezo y levantarme para continuar para mi es memorable la frase "por algo pasan las cosas", gracias por celebrar cada triunfo y tambien gracias por continuar en cada tropiezo. Pero sobre todo GRACIAS por confiar en mi dia a dia aveces hasta cuando ni yo misma confiaba, Gracias por ser mi maestra, amiga, confidente, psicóloga y mucho mas. Mil veces gracias. Gracias por ser una mujer admirable en todos los sentidos y por ser mi ejemplo de éxito. Gracias por su confianza. Agradezco y estoy muy orgullosa de ser su alumna, gracias doctora por hacer de mi una mujer fuerte y enseñarme que el éxito se consigue siendo perseverante y dedicado. Gracias doctora por TODO.

Agradezco al doctor Enrique Pedernera por que desde el primer dia que me presente fue muy amable y respetuso, gracias por todos los comentarios y observaciones que enriquecieron este poyecto. También por la confianza que brindo al permitirme coleccionar murciélagos en su casa, es algo que no puedo pagar. Gracias por ser un buen guía y siempre estar al pendiente de los avances participar activamente en mi desarrollo académico, por revisar mis escritos y guiarme para mejorar. Gracias por ser un un gran investigador con una gran calidad humana, un cariño especial para usted.

Agradezco al doctor Horacio Merchant. Doctor que le puedo decir, es un gran hombre y científico con una gran calidad humana, gracias por su apoyo en cada tutorial, la candidatura, las colectas en su casa y sus enseñanzas. Es un deleite escucharlo hablar gracias por ser una pieza importante en esta parte de mi vida.

Al biólogo experimental Gonzalo Acero por su valiosa asistencia técnica en el desarrollo de Western Blot, por los consejos y amistad.

Al M. en C. Alejandro Marmolejo, por la asistencia técnica, por los consejos y valiosa amistad.

A Noé Zacula por compartir tu tiempo conmigo, tu apoyo en las colectas y por las grandes charlas sobre todo y nada donde algunas veces encontrabamos piezas de este rompecabezas que es la ciencia. Cada día a tu lado me ha hecho más fuerte impulsándome a continuar en este apasionado viaje que es la vida.

Y finalmente pero no menos importante gracias a mis compañeros de laboratorio fue un largo camino y fue un placer compartirlo con ustedes, mucho aprendizaje, grandes momentos, gracias por su apoyo en todo momento. Un especial cariño a Adriana una amiga para toda la vida y Eva gracias por tu actitud positiva y tus palabras que levantaban mi alma. Y no olvido a mis ex compañeros Israel, Ivan, Hector, Gladys los estimo mucho. A Esteban por tu apoyo en las colectas y a la señora Raquel por su ayuda en el laboratorio, un cariño especial para ustedes.

DEDICATORIA



En memoria

De mi padre Francisco Jaime Porras Hernández ✠

Y mi pequeña hermana Karen Geraldineth Porras Gómez ✠

A pesar que no este físicamente viven en mi corazón y gran parte de esto fue por su apoyo, gracias padre por que siempre me enseñaste a levantarme y continuar te amo.

Y dedicado a mis dos pequeños amores

Enzo Valentino y Milena Constanza

Gracias por apoyarme dia a dia, alentarme a continuar y nunca nunca dejar vencerme. Gracias por ser tan buenos niños en verdad tuve que hacer algo muy bueno para tener la dicha de tenerlos a mi lado. Gracias por su cariño incondional. Es una fortuna ser su mami su sonrisa hace que todo tenga sentido y es mi motivo para continuar y esforzarme para ser una mejor persona, los amo y espero estén orgullosos de mi tanto como yo estoy de ustedes, esto es solo un capitulo aun nos faltan muchos más por escribir.

ÍNDICE



I.	RESUMEN	1
II.	ABSTRACT	3
1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1	Determinación sexual en mamíferos	5
1.2	Células Germinales Primordiales	7
1.3	Especificación de las Células Germinales Primordiales	9
1.4	Migración de las Células Germinales Primordiales	11
1.5	Diferenciación de las Células Germinales en la gónada.....	12
1.6	Desarrollo Gonadal	14
1.7	Cresta genital	15
1.8	Gónada bipotencial.....	16
1.9	Diferenciación testicular	16
1.10	Diferenciación ovárica	20
1.11	El ovario	22
1.12	Dogma de la biología Reproductiva	25
1.13	Neo-ovogénesis	26
1.14	Murciélago como modelo de estudio	26
1.15	Generalidades de los murciélagos.....	28
	1.5.1 <i>Artibeus jamaicensis</i>	28
	1.5.2 <i>Sturnira lilium</i>	31
2.	JUSTIFICACIÓN	34
3.	PREGUNTAS A CONTESTAR	36
4.	HIPÓTESIS	37
5.	OBJETIVOS	38
	5.1 Objetivos generales	38
	5.2 Objetivos particulares	38

6.	MATERIALES Y METODOS -----	39
6.1	Sitios de colecta -----	39
6.2	Colecta de murciélagos filostómidos -----	40
6.3	Uso y cuidado de animales de laboratorio (ratones) -----	42
6.4	Sacrificio y obtención de muestras -----	43
6.4.1	Embriones de murciélago -----	43
6.4.2	Hembras Adultas -----	44
6.5	Identificación del sexo en los embriones -----	44
6.5.1	Presencia del corpúsculo de Barr -----	44
6.6	Inmunofluorescencia en gónadas de murciélago -----	45
6.7	Microscopia de luz y electrónica en gónadas de murciélago -----	46
6.8	Proliferación celular en ovarios adultos -----	47
6.8.1	Inmunodetección de pH3, Ki-67 y PCNA -----	47
6.8.2	Incorporación de la 5-bromo-2'-deoxy-utidine (BrdU)-----	48
6.8.3	Doble inmunomarcaje Ddx4/BrdU -----	49
6.9	Purificación de Células Germinales Corticales Adultas -----	50
6.10	Disgregados-Reagregados -----	52
7.	RESULTADOS -----	53
7.1	Establecimiento de las etapas de desarrollo -----	53
7.2	Determinación del sexo cromosómico -----	54
7.3	Migración de las Células Germinales Primordiales -----	55
7.4	Formación de la gónada indiferenciada-----	55
7.5	Inicio de la diferenciación morfológica de la gónada -----	56
7.6	Diferenciación testicular -----	60
7.7	Diferenciación ovárica -----	62
7.8	Proliferación celular en ovarios adultos del murciélago <i>Artibeus Jamaicensis</i> -----	62
7.9	Marcaje con BrdU -----	66
7.10	Doble inmunodetección de Ddx4/ BrdU en CGCA -----	71
7.11	Disgregación celular de ovario adulto -----	71
7.12	Aislamiento de Células Germinales Corticales Adultas-----	72

7.13	Disgregados-Regregados (DR) -----	80
7.13.1	Ovario de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> -----	80
7.13.2	Ovario de ratón B6B5/EGFP y ovario de murciélago-----	86
7.13.3	Disgregados-reagregados de ovario de ratón y CGCA de murciélago -----	87
8.	DISCUSIÓN -----	96
8.1	Establecimiento de las etapas de desarrollo-----	97
8.2	Determinación del sexo cromosómico-----	98
8.3	Migración de las células germinales primordiales y formación de la gónada indiferenciada -----	99
8.4	Inicio de la diferenciación morfológica de la gónada-----	100
8.5	Diferenciación testicular-----	100
8.6	Diferenciación ovárica-----	101
8.7	Correlación entre el desarrollo de las extremidades y la gónada en ratón y murciélago -----	101
8.8	Identificación de la proliferación celular en ovarios adultos del murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> -----	103
8.9	Marcaje con BrdU-----	106
8.10	Doble inmunodetección de Ddx4/BrdU en CGCA-----	109
8.11	Disgregados-reagregados de ovario de ratón B6B5/EGFP y ovario de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> -----	109
8.12	Disgregados-reagregados de ovario de ratón y CGCA de murciélago -----	112
9.	Conclusiones -----	114
10.	Referencias -----	116
11.	Publicaciones -----	134



INDICE DE FIGURAS:

Figura 1:	Cronología del desarrollo de las células germinales.	24
Figura 2.	Mapa geográfico de los Municipios de Yautepec y Tepoztlán	40
Figura 3.	Colecta de murciélagos	41
Figura 4.	Metodología para el aislamiento de CGCA	51
Figura 5.	Metodología de disgregación reagregación (DR)	52
Figura 6.	Etapas principales del desarrollo embrionario de <i>Sturnira lilium</i>	54
Figura 7.	Determinación del sexo cromosómico en embriones <i>S. lilium</i>	55
Figura 8.	Microscopía confocal y Nomarski en un embrión en el St11 de <i>S. lilium</i>	57
Figura 9.	Establecimiento de la gónada indiferenciada en embriones del St13 de <i>Sturnira lilium</i> .	58
Figura 10.	Inicio de la diferenciación morfológica de la gónada en embriones de <i>Sturnira lilium</i> en el St17.	59
Figura 11.	Diferenciación morfológica del testículo en embriones de <i>Sturnira lilium</i> .	61
Figura 12.	Diferenciación morfológica del ovario en embriones de <i>Sturnira lilium</i> .	63
Figura 13.	Esquema de los puntos de expresión dentro del ciclo celular de Ki-67, PCNA, pH3 y BrdU.	64
Figura 14.	Inmunodetección de Ki-67, PCNA y pH3 en ovarios adultos de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> .	65
Figura 15.	Inmunofluorescencia de BrdU en intestino y ovario de ratón B6B5/EGFP.	67
Figura 16.	Inmunolocalización de BrdU en intestino y ovarios adultos de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> .	68
Figura 17.	Inmunolocalización de BrdU y Ki-67 en ovarios adultos de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> .	69
Figura 18.	Inmunolocalización de BrdU y PCNA en ovarios adultos de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> .	70
Figura 19.	Inmunofluorescencia de BrdU y Ddx4 en ovario de ratón.	73
Figura 20.	Doble inmunodetección de <i>Ddx4</i> y BrdU en ovario adulto de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> .	74
Figura 21.	Ratón de la cepa B6B5/EGFP.	75
Figura 22.	Murciélago filostómido <i>Artibeus jamaicensis</i> .	76
Figura 23.	Disgregado celular de ovario de ratón B6B5/EGFP.	77

Figura 24.	Observaciones <i>in situ</i> de ovarios de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i>	78
Figura 25.	Disgregado celular de ovario de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> .	79
Figura 26.	Inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina en el ovario adulto del murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i> .	81
Figura 27.	CGCA aisladas con fosfatasa alcalina del ovario derecho del murciélago adulto <i>Artibeus jamaicensis</i> .	82
Figura 28.	Microscopía electrónica de CGCA aisladas con fosfatasa alcalina del ovario derecho del murciélago adulto <i>Artibeus jamaicensis</i> .	83
Figura 29.	Seguimiento <i>in vitro</i> del cultivo celular de un DR de ovario murciélago <i>A. jamaicensis</i> .	84
Figura 30.	Inmunofluorescencia de Ddx4 y Stella en un DR de ovario de murciélago <i>Artibeus jamaicensis</i>	85
Figura 31.	Monitoreo <i>in vitro</i> del cultivo de órganos de un disgregado-reagregado de ovario de ovario de ratón B6B5/EGFP y ovario murciélago <i>A. jamaicensis</i> .	88
Figura 32.	Formación de folículos quiméricos xenogénicos. Compuestos de células somáticas de ratón y murciélago.	89
Figura 33:	Inmunofluorescencia de Laminina y Cx43 en un DR de ovario de ratón B6B5/EGFP y Ovario de murciélago	90
Figura 34.	Inmunolocalización del marcador de proliferación celular pH3 .	91
Figura 35.	Inmunodetección de la proteína del gen <i>Stella</i> en un DR cultivado 96 horas.	92
Figura 36.	Inmunolocalización de la proteína del gen Ddx4 en un DR de ovario de ratón y murciélago.	93
Figura 37.	Inmunofluorescencia de Ddx4 en un DR de ovario de ratón B6B5/EGFP y las CGCA aisladas del ovario del murciélago <i>A. jamaicensis</i>	94
Figura 38.	Inmunolocalización de la proteína del gen Stella en un DR de ovario de ratón B6B5/EGFP y CGCA aisladas.	95
Figura 39.	Correlación del desarrollo de la gónada en ratón y murciélago	104



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Fechas de colecta y número de individuos colectados	42
Tabla 2.	Anticuerpos primarios	46
Tabla 3.	Anticuerpos secundarios (fluorógenos)	47

I. RESUMEN



Hasta el momento la información disponible sobre los procesos que involucran a la línea germinal en mamíferos deriva principalmente de modelos experimentales como el ratón y la rata, sin embargo para los murciélagos, el conocimiento sobre este tema es escaso. A pesar de que se conocen patrones reproductivos en varias especies de murciélagos filostómidos, los procesos de determinación y diferenciación sexual gonadal, así como el establecimiento de la línea germinal y el desarrollo de ovarios en la vida adulta han sido poco estudiados. Al respecto, se ha establecido que en mamíferos, las células germinales primordiales (CGPs) surgen en la base del alantoides y son llevadas hacia el epitelio del intestino posterior, para luego migrar a los primordios gonadales. En el caso de los murciélagos no se sabe nada sobre este proceso, a pesar de ser el segundo orden con mayor número de especies. Sin embargo, en la actualidad se está incrementando la utilización de los murciélagos como animales de experimentación en estudios sobre diversos aspectos de la reproducción. Se muestra especial interés por las especies de la familia Phyllostomatidae, quienes presentan características de reproducción semejantes en muchos aspectos a la mayoría de los primates. En el presente trabajo, se estudiaron los eventos relevantes de la morfogénesis gonadal y se correlacionaron con el desarrollo embrionario. También se describió el patrón de expresión de los genes **Sox9**, **Mis**, y **Ddx4** durante la diferenciación sexual del murciélago filostómico *Sturnira liliium*. Las proteínas de los genes **Ddx4**, **Sox9** y **Mis** se detectaron en las gónadas de los embriones en diferentes etapas de desarrollo. Se identificaron 15 etapas (St) de desarrollo embrionario en *Sturnira liliium*. Se encontró que la formación del esbozo gonadal y el establecimiento de la gónada indiferenciada tienen lugar entre las etapas 11 y 14. El inicio de la diferenciación morfológica en la gónada se detecta por primera vez en las gónadas masculinas en St17. Las primeras CGPs en meiosis se detectan en el ovario en St19, mientras que en los testículos, las CGPs permanecen en arresto mitótico. Se observa que los cambios morfológicos que conducen al desarrollo testicular y ovárico en *Sturnira liliium* son similares a los descritos para el ratón; sin embargo, se establecerán diferencias con respecto al tiempo necesario para que estos procesos ocurran. Aunado a estos hallazgos, no existe información precisa sobre los procesos de morfogénesis ovárica en quirópteros. Se sabe que al igual que otros mamíferos la fertilidad en las hembras

depende de la capacidad de los ovarios para producir folículos. Dentro de este contexto, se concibe que la regeneración de ovocitos en el ovario de los mamíferos no se da en organismos adultos, sin embargo la existencia de células progenitoras de la línea germinal (CPG), las cuales renuevan la reserva ovárica después del nacimiento, ha sido documentado en invertebrados y peces. En mamíferos, hasta hace algunos años se había considerado que el ovario adulto estaba dotado de un número finito de ovocitos, postura conocida como el dogma de la biología reproductiva. Actualmente, diversos estudios sugieren que los ovarios posnatales de varias especies de mamíferos como los prosimios, el mono, el cerdo, el ratón y el humano poseen CPG capaces de renovar y mantener el desarrollo folicular postnatal. Aunado a esto, en el ovario adulto de murciélagos se ha observado la presencia de células localizadas en la región cortical con características similares a CPG. Estas células se denominaron Células Germinales Corticales Adultas (CGCA). Las CGCA expresan genes de línea germinal (***Ddx4***, ***Fragilis*** y ***Stella***), células pluripotentes (***Oct4*** y ***c-Kit***) y de proliferación celular (***pH3***), lo que indica que podrían corresponder a CPG. A pesar de estos hallazgos, la existencia de un mecanismo de neooogénesis en el ovario adulto de mamíferos sigue siendo controversial.

II. ABSTRACT



So far the information available on the processes involving the germline in mammals derives mainly from experimental models such as the mouse and the rat, however for bats, knowledge on this subject is scarce. Although reproductive patterns are known in several species of phyllostomid bats, the processes of gonadal sexual determination and differentiation, as well as the establishment of the germline and the development of ovaries in adult life, have been little studied. In this regard, it has been established that in mammals, the primordial germ cells (PGCs) arise at the base of the allantois and are taken to the epithelium of the posterior intestine, to then migrate to the gonadal primordia. In the case of bats, nothing is known about this process, despite being the second order with the largest number of species. However, currently the use of bats as experimental animals in studies on various aspects of reproduction is increasing. It shows special interest in the species of the family Phyllostomatidae, which present reproductive characteristics similar in many aspects to the majority of primates. In the present work, relevant events of gonadal morphogenesis were studied and correlated with embryonic development. The expression pattern of the **Sox9**, **Mis**, and **Ddx4** genes during the sexual differentiation of the phyllostomid bat *Sturnira lilium* was also described. The proteins of the **Ddx4**, **Sox9** and **Mis** genes were detected in the gonads of the embryos at different stages of development. We identified 15 stages (St) of embryonic development in *Sturnira lilium*. We found that the formation of the genital ridge and the establishment of the undifferentiated gonad take place between stages 11 and 14. The onset of morphological differentiation in the gonad is first detected in the male gonads at St17. The first PGCs in meiosis are detected in the ovary at St19, whereas in the testicles, the PGCs were in mitotic arrest. Structural changes leading to testicular and ovarian development in *Sturnira lilium* are observed to be similar to those described for the mouse, however, differences will be established concerning the time taken for these processes to occur. In addition to these findings, there is no precise information on the processes of ovarian morphogenesis in chiroptera. It is known that like other mammals fertility in females depends on the ability of the ovaries to produce follicles. Within this context, it is conceived that the regeneration

of oocytes in the ovary of mammals does not occur in adult organisms, however the existence of progenitor cells of the germline (GSCs), which renew the ovarian reserve after birth, it has been documented in invertebrates and fish. In mammals, until a few years ago it was considered that the adult ovary was endowed with a finite number of oocytes, a position known as the dogma of reproductive biology. Currently, several studies suggest that the postnatal ovaries of several species of mammals such as prosimians, monkeys, pigs, mice and humans have GSCs capable of renewing and maintaining postnatal follicular development. In addition, in the adult ovary of bats, the presence of cells located in the cortical region with characteristics similar to GSCs has been observed. These cells were called Adult Cortical Germ Cells (ACGC). ACGC express germline genes (***Ddx4***, ***Fragilis*** and ***Stella***), pluripotent cells (***Oct4*** and ***c-Kit***) and cell proliferation (***pH3***), indicating that they could correspond to GSCs. Despite these findings, the existence of a mechanism of neo-oogenesis in the adult ovary of mammals remains controversial.

1. INTRODUCCIÓN



1.1 DETERMINACIÓN SEXUAL

La determinación del sexo se refiere al proceso por el cual un organismo inicia la diferenciación hacia un macho o una hembra. Los mecanismos de determinación del sexo son notablemente variables entre los organismos (Capel, 2017). Algunas especies recurren a señales ambientales como la temperatura, la composición iónica del medio ambiente, el pH o la humedad para su determinación, este mecanismo es conocido como determinación ambiental del sexo (Crews, 1994). Un ejemplo bien documentado es la determinación del sexo dependiente de la temperatura que se da en algunos reptiles (Janzen y Paukstis, 1991). Se acepta generalmente que la determinación del sexo ambiental es el estado ancestral y que la determinación genética del sexo evolucionó como una condición derivada (Vallender y Lahn, 2006).

Muchas especies presentan mecanismos genéticos para la determinación del sexo, a través de los cromosomas sexuales. En 1916, Bridges describió los cromosomas sexuales en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, atribuyendo que el mecanismo de determinación estaba dado en relación a la proporción de los cromosomas X y autosomas es decir; 2:2 hembras (XX) y 1:2 machos (XY). En humanos los cromosomas X y Y, fueron descritos por Painter (1923), postulando que presentaban el mismo mecanismo que la mosca. Sin embargo, 30 años después esta hipótesis se anuló concluyendo que la determinación del sexo en mamíferos es dependiente del cromosoma Y. Los sistemas mejor estudiados de determinación genética del sexo incluyen al sistema XX:XY en mamíferos, el sistema XX:XO en *Caenorhabditis elegans* y el sistema ZZ:ZW en aves (Smith y Sinclair, 2004).

Los mamíferos euterios presentan determinación sexual genética (**DSG**). Las hembras tienen dos cromosomas X y los machos un cromosoma X y un cromosoma Y donde se localiza un gen dominante que lleva a la determinación del sexo masculino. El desarrollo sexual en mamíferos se ha descrito como un proceso secuencial que involucra al menos cuatro eventos: en el primer paso se establece el sexo genético del embrión, proceso que ocurre en el momento que el ovulo es fecundado por un espermatozoide con carga genética X o Y. El segundo evento se refiere a la determinación del sexo de acuerdo con el cromosoma adquirido; posteriormente se da el establecimiento del sexo gonadal, donde la gónada bipotencial es morfológicamente diferenciada hacia un ovario o un testículo guiado por la expresión génica. Y por último, se da la diferenciación fenotípica masculina o femenina como resultado de las secreciones hormonales de los testículos u ovarios en desarrollo ([Nordqvist y Lovell-Badge, 1994](#)).

El desarrollo de los testículos está asociado con la presencia de un gen ligado al locus del cromosoma Y, llamado factor determinante testicular (**FDT**), este hallazgo surgió del análisis de mutaciones que conducen a diversos grados de reversión sexual y donde el sexo cromosómico no correlaciona con el sexo fenotípico. En el año de 1990 dos grupos independientes identificaron y aislaron el factor determinante testicular. Fue cartografiado en humanos mediante el análisis de machos XX ([Sinclair et al., 1990](#)), encontrando que el gen **Sry** (sex determining región Y) es el responsable de la determinación testicular en mamíferos. Este hallazgo se corroboró en ratón con la identificación de un gen ortólogo: **Sry** ([Koopman et al., 1990](#)). En ambos modelos se concluyó que el gen **Sry** es necesario y suficiente para desencadenar el desarrollo masculino, ya que mutaciones o deleciones en este gen conducen al desarrollo del fenotipo femenino ([Lovell-Badge y Robertson, 1990](#); [Gubbay et al., 1992](#)). Por el contrario, la presencia de este gen en ratones transgénicos XX desarrollan testículos y se da una reversión completa del sexo ([Koopman et al., 1991](#); [Eicher et al., 1995](#)). Se cree que la expresión de **Sry** en embriones XY durante el establecimiento de la gónada bipotencial interrumpe el desarrollo de la vía ovárica e inicia el desarrollo

del testículo (Lovell-Badge, 1992). Hasta el momento, no se han identificado genes determinantes de los ovarios en esta vía, algunos investigadores sostienen que el gen determinante del sexo masculino reprime la vía femenina (Gubbay y Lovell-Badge, 1994; Jimenez *et al.*, 1996; McElreavey *et al.*, 1993).

Finalmente se puede concluir que el gen **Sry** funciona como un interruptor molecular; sin embargo, está claro que hay muchos genes críticos requeridos tanto en las vías masculinas como femeninas que determinan el sexo.

1.2 CELULAS GERMINALES PRIMORDIALES

Las células germinales primordiales (CGPs) son las células precursoras de los gametos. Fueron reconocidas a mediados del siglo XX por características morfológicas tales como su tamaño grande y nucléolo prominente. Witschi (1948) identificó a las CGPs en humano, las ubicó en el saco vitelino alrededor de los 24 días de gestación [o día embrionario 24 (E24)] cerca de la unión con el alantoides. Describió que a los 26 días todas las CGPs residen en el intestino posterior. En embriones de 28 días, se observan algunas CGPs dejando el intestino posterior y entrando en la región de las crestas genitales en desarrollo. A los 37 días, todas las CGPs se encuentran en las crestas genitales. Witschi señaló que las CGPs en el intestino posterior emiten pseudópodos mostrando signos de actividad locomotora. Sugirió que la migración en esta etapa puede deberse a movimientos activos, observaciones confirmadas en el ratón 50 años después (Molyneaux *et al.*, 2001).

En el ratón, Chiquoine (1954) mediante tinciones con fosfatasa alcalina (FA) determinó que las CGPs residen en el alantoides y el mesodermo del saco vitelino en el extremo caudal de la línea primitiva alrededor de los 8 *días postcoitum* (*dpc*), evidenció que las células siguen un recorrido similar al de humanos pasando del saco vitelino a las crestas genitales a través del intestino posterior y su mesenterio. Las CGPs entran en el intestino posterior en desarrollo alrededor de los 8.5 *dpc* y residen allí hasta los 9 *dpc*, la entrada a las crestas genitales

comienza a los 10 *dpc*. El inicio de la meiosis en las hembras representa el punto final en el desarrollo de las CGPs ([Sasaki y Matsui, 2008](#); [Leitch et al., 2013](#)). [Ginsburg et al., \(1990\)](#) mediante modificaciones a la tinción de FA identificaron a las CGPs a los 7 *dpc* permitiendo una descripción detallada de su ubicación durante la gastrulación. Localizaron a las CGPs en la línea primitiva posterior al mesodermo extraembrionario, posteriormente se ubicaron en el mesodermo extraembrionario posicionándose en la base del alantoides y de ahí se observó que migran al endodermo del intestino posterior en desarrollo.

Las CGPs son fácilmente identificables con el microscopio de luz; estas células son de mayor tamaño y más claras que las células somáticas cercanas, son basófilas y con una alta actividad de la enzima fosfatasa alcalina en la periferia del citoplasma; con el microscopio de electrónico transmisión se logra observar que son de forma redondeada u ovalada con contornos irregulares, poseen un diámetro que oscila entre 15 y 20 μm ; el núcleo con forma esférica que contiene una cromatina granular muy fina, ocupa una posición excéntrica y tiene un número variable de nucléolos, cerca del núcleo hay mitocondrias esféricas con crestas laminares, el retículo endoplásmico rugoso, los polirribosomas y los ribosomas libres son muy abundantes ([Chuaire, 2002](#)). En esta etapa es común identificar depósitos de glucógeno y gotas lipídicas que le sirven de reserva energética a la célula.

Las células germinales (CG) se someten a dos fases significativas durante su desarrollo; la primera ocurre durante la embriogénesis temprana, donde son especificadas como CGPs por la influencia de varios genes como **BMPs**, **Fragilis** y **Stella** ([Ewen y Koopman, 2010](#)) e inician el proceso de migración hacia la cresta genital ([Saffman y Lasko, 1999](#); [Gomperts et al., 1994](#)); y la segunda es cuando las CGPs inician la meiosis para dar lugar a los gametos.

1.3 ESPECIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

En mamíferos las células germinales se especifican mediante señales inductivas momentos antes de la gastrulación. Estas señales están dictadas por el ectodermo extra-embriónico y el endodermo visceral dentro del epiblasto posterior que es adyacente a la línea primitiva en formación (Marlow, 2015). A diferencia de la mosca y los peces, en ratones no se ha descubierto ningún factor que sea necesario y suficiente para especificar a las CGPs. Para su especificación se requieren una red de expresión genética (Chang y Matzuk, 2001; Tremblay *et al.*, 2001).

La vía de señalización propuesta para la especificación de las CGPs se ha desarrollado con base en estudios *in vitro* (Ohinata *et al.*, 2009). Se propone que la proteína morfogenética de hueso 4 (**BMP4**) expresada por el ectodermo extra-embriónico (ExE) activa la expresión de los genes **Blimp1** y **Prdm14** de una manera dosis-dependiente. **Bmp2** expresada en el endodermo visceral (VE) asegura los altos niveles de **BMP** en el epiblasto proximal (Lawson *et al.*, 1999; Ohinata *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2005). También se ha propuesto que la señalización de **WNT** es esencial para la especificación de las CGPs ya que en ratones knockout para el gen **Wnt3** no se observa la expresión de **Blimp1** en respuesta a **Bmp4** (Ohinata *et al.*, 2009). **Wnt3** es expresado en el epiblasto y en VE a los 5.5 *dpc* (Liu *et al.*, 1999). Por lo tanto, **Wnt3** induce a las células en el epiblasto a expresar **Blimp1** en respuesta a **Bmp4**. Posteriormente se estableció que **Blimp1** y **Prdm14** son reguladores clave para la especificación, proliferación y sobrevivencia de las CGPs (Ohinata *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2005; Yabuta *et al.*, 2006; Kurimoto *et al.*, 2008; Yamaji *et al.*, 2008). **Blimp1** y **Prdm14** junto con **Tcfap2c** (Transcription Factor AP-2 Gamma) (Weber *et al.*, 2010) actúan suprimiendo la expresión génica somática y promoviendo la expresión de genes específicos de línea germinal.

Blimp1, es regulado por **Lin28** a través de la represión de microRNAs de la familia **Let-7** (Kurimoto *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2008). **Blimp1** se expresa en células del epiblasto proximal en la región posterior del embrión a los 6.25 *dpc*, formando grupos de células con alta actividad a la fosfatasa alcalina (Ohinata *et al.*, 2005). Por otra parte **Prdm14** se expresa por primera vez a los 6.5 *dpc* (Yamaji *et al.*, 2008), aunque la activación de **Prdm14** es independiente de **Blimp1** (Yamaji *et al.*, 2008), la expresión de **Tcfap2c** a los 6.75 *dpc* parece depender de **Blimp1** (Kurimoto *et al.* 2008). A partir de los 6.75 *dpc* en adelante, las células positivas a **Blimp1** comienzan a reprimir los genes **HOX** (**Hoxa1**, **Hoxb1**, **Lim1** y **Evx1**) involucrados con la diferenciación celular somática (Saitou y Yamaji 2012) y expresan genes de pluripotencia como **Oct4**, **Sox2** y **Nanog** (Yamaguchi *et al.*, 2005, Kurimoto *et al.*, 2008), lo que lleva a la expresión de **Fragillis** y **Stella** (Saitou *et al.*, 2002). **Ifitm3** o **Fragillis** (interferon-induced transmembrane protein 3) es un miembro de las proteínas transmembrana de interferón-inducible (Tanaka y Matsui 2002). **Dppa3** o **Stella** (Developmental pluripotency-associated 3) es una pequeña proteína acarreadora núcleo-citoplasma. **Fragillis** comienza a mostrar expresión alrededor de las células epibásticas más proximales entre los 6.25 y 6.5 *dpc* y su expresión se intensifica en células positivas a fosfatasa alcalina en el mesodermo extra-embriónico entre los 7.0 y 7.25 *dpc* **Stella** comienza a expresarse exclusivamente en algunas de las células positivas a **Fragillis** entre los 7.0 y 7.25 *dpc* y se mantiene durante toda la ruta de migración (Saito y Yamaji, 2012).

Las células positivas a **Stella** y **Fragilis** continúan reprimiendo la expresión de **Hoxb1** y **Hoxa1**, por lo que se ha propuesto que las células **Stella**-positivas y **HOX**-negativas son CGPs especificadas (Saitou *et al.*, 2002). Estudios en ratones *knockout* revelaron que ni **Fragillis** ni **Stella** son esenciales para la especificación de las CGPs (Payer *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2008); sin embargo, se encontró que **Stella** es un factor crítico para proteger el genoma materno y genes paternos de la desmetilación de ADN que ocurre en el cigoto (Nakamura *et al.*, 2007),

mientras que ***Fragilis*** tiene una función crítica al restringir la replicación de virus patogénicos como la influenza (Brass *et al.*, 2009; Everitt *et al.*, 2012).

1.4 MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

Las CGPs son inducidas a partir de una población de células en la base del alantoides, mecanismo regulado por **BMPs** y una combinación de cambios epigenéticos que silencian los genes de diferenciación somática y activan los genes de pluripotencia (Durcova-Hills y Capel, 2008).

Las CGPs se mueven hacia las gónadas mediante movimientos pasivos y activos. A medida que se produce la gastrulación, las CGPs se incorporan al intestino posterior donde se mueven aleatoriamente entre las células del epitelio intestinal. Durante este período, las CGPs están conectadas por filopodios (Gomperts *et al.*, 1994). Entre los 9.0 y 9.5 *dpc*, emergen en la región del mesodermo intermedio, momento en el cual se está formando la cresta urogenital. Desde ahí atraviesan el mesonefros y colonizan las gónadas en desarrollo entre los 10.0 y 11.5 *dpc* macho, las CGPs se encierran dentro de cordones y entran en arresto mitótico. En el caso de los ovarios en desarrollo, las CGPs proliferan por mitosis hasta los 13.5 *dpc*, momento en el que se inicia la meiosis para quedar arrestadas en la profase I de la primera división meiótica (McLaren y Southee, 1997). Las células germinales meióticas en las hembras son esenciales para la formación y el mantenimiento de los folículos ováricos (McLaren, 2003; McLaren y Lawson 2005).

Se ha propuesto que ***Sdf-1*** y ***Cxcr4*** funcionan como un sistema atrayente para las CGPs (Ara *et al.*, 2003; Molyneaux *et al.*, 2003). Esta vía de señalización parece ser indispensable para la migración fuera del endodermo. ***Sdf-1*** se expresa en las crestas genitales y en el mesénquima circundante, mientras que ***Cxcr4*** se expresa en las CGPs. La eliminación de ***Sdf-1*** o ***Cxcr4*** produce que un número reducido

de CGPs arriben a la cresta genital; mientras que la expresión ectópica de **Sdf-1** hace que las CGPs migren de manera ectópica (Richardson y Lehmann, 2010).

El gen **c-Kit** y su ligando **Steel** juegan un rol muy importante en la proliferación, migración y supervivencia de las CGPs. Se ha reportado en ratones mutantes para **c-Kit** y/o **Steel** la localización de CGPs fuera de la gónada (McCoshen y McCallion, 1975; Buehr *et al.*, 1993). Otros estudios sugieren que la interacción **c-Kit-Steel** es necesaria para que las CGPs se muevan a lo largo del endodermo del intestino posterior (Mahakali *et al.*, 2005). Informes recientes han evidenciado que **Steel** y **c-Kit** regulan la motilidad de las CGPs, ya que la eliminación de **Steel** conduce a las CGPs a migrar a una menor velocidad (Bendel-Stenzel *et al.*, 2000).

Se ha observado que los factores de crecimiento de fibroblastos (**FGF**) también están involucrados en la motilidad y proliferación de las CGPs en etapa de migración. Estos efectos están mediados por dos receptores de **FGF** expresados en células germinales, **FGF2**, un ligando para **FGFR1IIIc**, afecta la motilidad, mientras que **FGF7**, un ligando para **FGFR2IIIb** afecta la supervivencia de las CGPs (Takeuchi *et al.*, 2005). También se ha evidenciado que moléculas de adhesión juegan un papel importante en la migración de las CGPs. **E-cadherina** se expresa en las CGPs a medida que estas migran fuera del intestino posterior, la interrupción de la función **E-cadherina** causa problemas con la adhesión lo que provoca que las CGPs se queden fuera de la gónada (Bendel-Stenzel *et al.*, 2000).

1.5 DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES EN LA GÓNADA

Las células germinales son sexualmente bipotenciales en la etapa migratoria y su diferenciación sexual se inicia después de la colonización de la gónada. Entre los 10.5 y los 13.5 *dpc* las CGPs continúan dividiéndose mitóticamente tanto en las gónadas XX como en XY. El marcador más conspicuo de la divergencia entre las CGPs XX y las XY es la regulación del ciclo celular. Las CGPs XX inician el

proceso de meiosis en etapas tempranas del desarrollo embrionario; mientras que las CGPs XY permanecen arrestadas en las fases G1/G0 del ciclo celular e inician la meiosis hasta la pubertad. Estos eventos fueron controversiales por muchos años, llevando a muchos a preguntarse el o los factores que inducían la meiosis en las CGPs localizadas en las gónadas femeninas y que producía la inhibición de este mecanismo en las CGPs localizadas en las gónadas masculinas (Saga, 2008).

El comportamiento dimórfico de las CGPs se ha relacionado con la expresión del gen ***Stra8***, el cual se expresa en las gónadas de las hembras entre los 12.5 y los 15.5 *dpc* en una oleada antero-posterior (Menke *et al.*, 2003). El gen ***Stra8*** es estimulado por el **ácido retinoico (AR)**, el cual podría ser responsable de inducir meiosis mediante la activación de ***Stra8***. El bloqueo del ácido retinoico por inhibidores o antagonistas de los receptores conduce a que las CGPs no inician la meiosis (Bowles y Koopman, 2007; Koubova *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la pérdida del gen ***Stra8*** causa que las CGPs no inician la meiosis en la gónada XX (Baltus *et al.*, 2006). El gen que codifica para la enzima ***Cyp26b1*** se expresa en gónadas de ratón de ambos sexos a los 11.5 *dpc*, a los 12.5 *dpc* se vuelve dimórfico ya que disminuye en las gónadas XX y se mantiene en las gónadas XY. Como ***Cyp26b1*** codifica una enzima que degrada el ácido retinoico, se reconoció que la regulación positiva de este gen en la vía de testículo podría explicar por qué el ácido retinoico no es eficaz en la activación de la meiosis en las CGPs del testículo (Koubova *et al.*, 2006; MacLean *et al.*, 2007). La pérdida de función de ***Cyp26b1*** lleva a las CGPs a iniciar la meiosis en las gónadas XY y su posterior pérdida por vía apoptótica (MacLean *et al.*, 2007). Esto sugiere un mecanismo en el que altos niveles de ácido retinoico y bajos niveles de ***Cyp26b1*** conducen a la expresión de ***Stra8*** y la entrada en meiosis de las CGPs en las gónadas XX, mientras que los altos niveles de ***Cyp26b1*** conducen a bajos niveles de ácido retinoico lo que bloquea el inicio de la meiosis de las CGPs en las gónadas XY (Bowles y Koopman, 2007).

1.6 DESARROLLO GÓNADAL

El primer signo de la gonadogénesis en ratones es la formación del sistema urogenital a partir del mesodermo intermedio, que comienza aproximadamente a los 9.0-9.5 *dpc*. Alrededor de los 10.5 *dpc*, el sistema urogenital es pareado y llena la mayor parte de la cavidad celómica (Morrish y Sinclair, 2002). El sistema urogenital se compone de tres segmentos de anterior a posterior: **pronefros**, que incluye el primordio suprarrenal cerca de su extremo caudal, el **mesonefros**, que es la región central de donde nacen las gónadas y el **metanefros**, que hace referencia a la región más posterior a partir de la cual se forma el riñón; siendo el mesonefros el único que interviene en el desarrollo del sistema genital.

Temprano en el desarrollo el mesodermo, recubierto por el epitelio celómico, hace protrusión en la cavidad celómica del embrión formando las crestas urogenitales, que ulteriormente se dividen en crestas gonadales, medialmente, y crestas urinarias, lateralmente. Durante el período indiferenciado del desarrollo gonadal, las crestas gonadales de ambos sexos están constituidas por células mesenquimáticas revestidas por el epitelio celómico. Estos esbozos de las futuras gónadas son bipotenciales, es decir que podrán evolucionar hacia testículos o hacia ovarios según la constitución genética del individuo, dando origen a los componentes somáticos de las gónadas. En el mesonefros, existen además dos estructuras tubulares que corren longitudinalmente: el conducto mesonéfrico o conducto de Wolff y una invaginación del epitelio celómico sobre el borde lateral de cada cresta gonadal que da origen al conducto paramesonéfrico o conducto de Müller, que queda incluido en el mesodermo mesonéfrico. Estos dos pares de conductos constituyen los esbozos de los genitales internos. En las hembras, el conducto de Müller se diferencia en el oviducto, el útero y el tercio superior de la vagina, en machos este conducto sufre una regresión por acción de la hormona anti-Mülleriana (**AMH**). En las hembras, el conducto Wolff degenerará pero en los machos, la testosterona secretada por las células de Leydig induce su diferenciación formando el epidídimo, el conducto deferente y las vesículas seminales (Morrish y Sinclair, 2002).

1.7 CRESTA GENITAL

En los ratones, las crestas genitales aparecen por primera vez entre los 10 y los 10.5 *dpc* como un engrosamiento del epitelio celómico que recubre las superficies ventromediales del mesonefros. Las crestas genitales surgen a ambos lados del embrión como estructuras pareadas situadas dorsalmente en la cavidad celómica (Svingen y Koopman, 2013). La proliferación del epitelio celómico que recubre cada mesonefros conduce al crecimiento de la cresta genital (Merchant 1975; Pelliniemi 1975; Pelliniemi y Frojzman, 2001; Karl y Capel 1998). En la cresta genital existen células somáticas que se originan del mesodermo, que en su inicio son de tres tipos celulares: mesenquimáticas, mesoteliales y endoteliales; las de tipo mesenquimáticas y mesoteliales (epitelio celómico) dan lugar a una gran actividad proliferativa cuando llegan las CGPs, formando un blastema gonadal. Se cree que los precursores de las células de soporte (denominadas así por su papel en el mantenimiento y nutrición de las células germinales) y las células secretoras de esteroides están presentes en la gónada temprana (Merchant-Larios *et al.*, 1993). Los precursores celulares de soporte continúan delaminándose desde el epitelio celómico hasta los 11.5 *dpc* (Karl y Capel, 1998). Por lo tanto, las gónadas se desarrollan a partir de tres fuentes celulares: el mesotelio (epitelio celómico) que recubre la pared abdominal posterior, el mesénquima subyacente (mesodermo intermedio) y las CGPs (Merchant y Taketo, 1991; Silverman, 2004).

Ya formado el blastema gonadal embrionario, se diferencian dos compartimentos gonadales importantes: el estroma y los cordones sexuales (Merchant y Moreno, 2003). Los cordones sexuales son arreglos epiteliales que se encuentran delimitados por una lámina basal y dentro de ellos se encuentran las CGPs. Por otro lado, en el estroma se encuentran células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos que irrigan la gónada.

1.8 GÓNADA BIPOTENCIAL

La gónada bipotencial es un primordio indiferenciado compuesto de células precursoras bipotenciales que pueden seguir uno de los dos posibles destinos: diferenciarse como ovario o como testículo. Este primordio gonadal está conformado por una porción cortical y una medular. En hembras la región cortical se desarrolla mientras que la región medular se degenera formando una cavidad; mientras que en machos, la región cortical entra en regresión y la región medular se desarrolla (Hayes, 1998). En etapas tempranas del desarrollo gonadal en ratón alrededor de los 11 *dpc* las gónadas de ambos sexos son morfológicamente idénticas, sin embargo en el caso de los machos genéticos ya existe una diferenciación de la gónada a nivel molecular, ya que la expresión del factor determinante de testículo (**Sry**) se observa a partir de los 10.5 *dpc*, alcanza un pico máximo de expresión a los 11.5 *dpc* y luego cesa abruptamente a los 12.5 *dpc* (Hacker *et al.*, 1995).

Una de las funciones más importantes del gen **Sry** es la inducción de la diferenciación de las células de Sertoli en el testículo, desencadenando una serie de eventos fisiológicos, morfológicos y moleculares responsables de la diferenciación sexual masculina. En ausencia de este factor, los eventos de diferenciación sexual gonadal serán dirigidos hacia características femeninas.

1.9 DIFERENCIACIÓN TESTICULAR

El factor determinante de la diferenciación testicular, el gen **Sry**, es un factor de transcripción con un dominio de alta movilidad de unión al ADN (Polanco y Koopman, 2007; Kashimada y Koopman, 2010). La expresión del **Sry** es breve y está cuidadosamente regulada; sin embargo, aún no está bien caracterizada su vía de activación, se han propuesto varios candidatos pero aún no se ha dilucidado completamente. Uno de los genes propuestos para la activación del **Sry** es el gen **Wt1** (Wilms' tumour 1). **Wt1** tiene dos isoformas activas en la gónada, con una inserción o una delección de tres aminoácidos, lisina (K), tirosina (T) y

serina (S), entre dos motivos de dedos de zinc (Haber *et al.*, 1991; Hammes *et al.*, 2001). Cada isoforma presenta una función diferente, por un lado en ratones Knockout para **Wt1**+ la inserción de KTS se ha visto que es necesario para el mantenimiento gonadal, sin embargo no se ha mostrado evidencia de que esta sea capaz de transactivar el promotor de **Sry** *in vitro*. La segunda isoforma de **Wt1** con delección de KTS ha mostrado en ratones knockout una reversión completa del sexo presumiblemente por una expresión anormalmente baja de **Sry** (Hammes *et al.*, 2001).

La expresión de **Sry** debe alcanzar un umbral para desencadenar la diferenciación testicular. En el caso del ratón, la expresión del **Sry** se inicia a los 10.5 *dpc* alcanza un umbral a los 11.5 *dpc* y se reprime a los 12.5 (Koopman *et al.*, 1990; Hacker *et al.*, 1995; Jeske *et al.*, 1995), su expresión presenta un patrón medula-corteza ya que inicia en el centro de la gónada y se expande a los polos (Bullejos *et al.*, 2001). Este gen se expresa específicamente en las células precursoras de Sertoli, desencadenando su diferenciación en células de Sertoli. La diferenciación de las células de Sertoli (células de soporte) da como resultado la organización de dos compartimientos en el testículo en diferenciación: los cordones testiculares, formados por agregados de células germinales rodeadas por una capa de células de Sertoli y el compartimento estromático que rodea a los cordones testiculares y está conformado por células mioideas, fibroblastos, vasos sanguíneos y células de Leydig de naturaleza esteroideogénica (McClelland *et al.*, 2012).

En las células de Sertoli, el gen **Sry** actúa como un factor de transcripción activando la expresión de otros genes de suma importancia en la morfogénesis testicular. Uno de los principales genes activados por el **Sry** es el gen **Sox9** es considerado como un factor autosómico de la determinación sexual masculina, ya que en ausencia de **Sry** o expresándose ectópicamente en gónadas XX es capaz de inducir morfogénesis testicular.

Sox9 es un gen autosómico que pertenece a la familia de proteínas HMG y se ubica en el brazo largo del cromosoma 11 de ratón. Codifica para un factor de transcripción que está involucrado en el desarrollo de los huesos y en la determinación del sexo (Foster *et al.*, 1994, Wagner *et al.*, 1994). Estudios a nivel de proteínas demostraron que en el ratón, las gónadas XX no expresan esta proteína y que en gónadas XY comienza su expresión en la región central de la gónada a los 11 *dpc* poco tiempo después del inicio de la expresión de **Sry**. Posteriormente a partir de los 11.5 *dpc* se detecta en toda la gónada (Moreno-Mendoza *et al.*, 2003). Se ha reportado que la expresión de un transgen de **Sry** induce la expresión de **Sox9** y la morfogénesis testicular en la región central de la gónada, pero no es suficiente para estabilizar la expresión de **Sox9** o la diferenciación testicular en ambos polos (Hiramatsu *et al.*, 2010). En otros estudios se mostró que gónadas de ambos sexos expresan el mRNA a los 10.5 *dpc* y a los 11.5 *dpc* se mantiene en los testículos y desaparece en los ovarios (Kent *et al.*, 1996). De manera similar, en humanos se han detectado los transcritos de **Sox9** en ambos sexos observándose niveles mayores en las gónadas XY (Hanley *et al.*, 2000). **Sox9** actúa activando y/o regulando otros genes implicados en el desarrollo testicular y la duplicación de este gen produce una reversión (XX) de hembra a macho (Huang *et al.*, 1999; Vilain y McCabe 1998).

Actualmente, el conocimiento sobre los factores que intervienen en la diferenciación testicular ha avanzado considerablemente. Hasta el momento, se conocen más de 2000 genes que están relacionados con el desarrollo de la gónada (Nef *et al.*, 2005). Algunos de los genes que se ha visto participan activamente en la diferenciación sexual masculina y pueden o no estar relacionados al gen **Sry** son la hormona anti-mülleriana (**AMH**) y la 3 β -hidroxi esteroide deshidrogenasa (**3 β -HSD**).

La **AMH** es una glicoproteína que es codificada por un gen que pertenece a la familia de Factores de Crecimiento Transformantes β (**TGF- β**) y está ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 de ratón y en el 19 de humano. En etapas

embrionarias, la **AMH** es expresada por las células de Sertoli (Munsterberg y Lovell-Badge, 1991) y se ha observado que su expresión inicia 20 horas después del gen **Sry** (Hacker *et al.*, 1995). Se ha establecido que su expresión es activada por acción de **Sox9** y regulada positivamente por la acción de los genes autosómicos **Sf1**, **Wt1** y **Gata4** (Arango *et al.*, 1999; Marshall y Harley, 2000). Es la hormona responsable de la regresión de los conductos de Müller (Roberts *et al.*, 2002). En ratones mutantes que carecen de la **AMH**, no se suprime el desarrollo de los conductos de Müller y se presenta pseudohermafroditismo (Arango *et al.*, 1999). La mutación de este gen o la insensibilidad a la proteína en humanos, produce el Síndrome de Conductos Mullerianos Persistentes asociado a criptorquidia bilateral, que se caracteriza por la falta de descenso testicular (Lang-Muritano *et al.*, 2001). En el ratón, cuando hay expresión de la **AMH** en hembras se observa ausencia de oviducto y útero (Behringer *et al.*, 1990) y desarrollo de un ovario en el que se puede llegar a observar bloqueo de la meiosis y se induce la pérdida de células germinales (Josso *et al.*, 1998).

Con respecto a la **3 β -HSD1**, se ha observado que en etapas postnatales, las gónadas de los mamíferos producen tres grupos esenciales de hormonas esteroides (Wilson *et al.*, 1981): las progestinas (Progesterona), los estrógenos (Estrona y Estradiol) y los andrógenos (Androstenediona y Testosterona). Dichos metabolitos se producen en la vía esteroidogénica a partir de colesterol, y son sintetizados por la acción de varias enzimas (Simard *et al.*, 2005). La enzima **3 β -HSD** es importante en la síntesis de Progesterona y Testosterona (Lorence *et al.*, 1990), y la P450arom participa en la síntesis de Estrona y Estradiol (Simpson *et al.*, 1994). Estas hormonas esteroides son importantes en la regulación de la fisiología sexual de los mamíferos adultos y en etapas embrionarias se sabe que la producción de Testosterona es un evento crucial en la diferenciación masculina.

El gen **3 β -HSD1** pertenece a la familia de genes **3 β -HSD**, en la que se encuentran seis genes que producen una isoforma (I-VI) de enzima que se expresa en un tejido específico (Abbaszade *et al.*, 1997; Bain *et al.*, 1991; 1993). Las isoformas I

y VI se expresan en gónadas y participan en la biosíntesis de hormonas esteroides (Abbaszade *et al.*, 1997) por lo que son requeridas para la producción de los andrógenos y estrógenos necesarios para la diferenciación (Greco y Payne, 1994) y función testicular (Baker *et al.*, 1999). La **3 β -HSD1** comienza a expresarse entre los 13 y 13.5 *dpc* en las células precursoras de Leydig y se mantiene hasta el nacimiento (Baker *et al.*, 1999). La expresión de esta enzima parece estar regulada por acción de **Sf1**, **Stat5**, **Dax1** y **Gata4** (Simard *et al.*, 2005).

Las células de Leydig producen hormonas esteroides que refuerzan la diferenciación específica del testículo (Wu *et al.*, 2007). En el ratón, las células de Leydig surgen a los 12.5 *dpc* aproximadamente (Griswold y Behringer, 2009) con varios orígenes que incluyen el epitelio celómico y el mesonefros (DeFalco *et al.*, 2012). Varias moléculas han sido implicadas en el mantenimiento y diferenciación de las células de Leydig entre ellos; **Sf1** presente en células presteroidogénicas y pre-Sertoli en la cresta genital en desarrollo (Luo *et al.*, 1994; Hatano *et al.*, 1994) el cual actúa como un regulador clave de genes que codifican las hidroxilasas esteroideas (Ikeda *et al.*, 1994). Se ha implicado a **hedgehog** y a su homólogo receptor **patched-1** como reguladores activos de la diferenciación de Leydig, ya que la inhibición química de la señalización de **hedgehog** a 11.5 *dpc* abolió completamente la expresión de enzimas esteroidogénicas, confirmando que la señalización de **hedgehog/patched-1** es esencial para la diferenciación (Yao *et al.*, 2002).

1.10 DIFERENCIACIÓN OVÁRICA

A pesar que se han descrito 1223 genes regulados positivamente en la gónadas XX durante su diferenciación ovárica (Nef *et al.*, 2005), hasta el momento no se ha reportado un gen determinante de la diferenciación ovárica análogo al **Sry**. Se han identificado diferentes genes encargados de esta función por lo que se ha propuesto que el desarrollo del ovario depende de un mecanismo regulado por una red de genes (Kim *et al.*, 2006).

Para la diferenciación de la gónada bipotencial hacia ovario se tenía el concepto clásico de que al estar ausente el gen **Sry** este proceso se iniciaba de una forma pasiva. En la actualidad existen evidencias que demuestran que la diferenciación del ovario está promovida por genes determinantes femeninos que antagonizan el desarrollo testicular para favorecer específicamente la formación del ovario. [Maatouk y col. \(2008\)](#) reportaron que la estabilización de **β -catenina** es suficiente para inducir la vía femenina en ratones XY, proponiendo que **β -catenina** es un factor pro-ovárico. **β -catenina** es una proteína de unión adherente crítica para el establecimiento y mantenimiento de las capas epiteliales, además de que media la adhesión entre células, comunica señales y ancla al citoesqueleto. Se ha sugerido que el gen **Rspo1** en sinergia con **Wnt4** son necesarios para la estabilización de **β -catenina** en gónadas XX lo que induce al desarrollo normal del ovario ([Kim et al., 2006](#)). El gen **Rspo1** había sido postulado como el determinante ovárico por degradar a genes que interactúan con **Sry**. **Rspo1** pertenece a la familia de genes **R-spondin** que codifican para moléculas de secreción esta es una familia de ligandos que interactúan con un complejo receptor Fzd/LPR ([Nam et al., 2006](#)). En ratón **Rspo1** inicia su expresión a los 10.5 *dpc* detectándose en el epitelio celómico de la cresta genital en ambos sexos, posteriormente se expresa de manera dimórfica presentando niveles más altos en gónadas XX alrededor de los 12 *dpc* mostrando el máximo nivel de expresión a los 14 *dpc* ([Parma et al., 2006](#)).

Dentro de la cascada génica de la diferenciación ovárica, se ha propuesto al gen **Foxl2** como un factor específico de la diferenciación ovárica. Su expresión es detectable a partir de los 12.0 *dpc* ([Auguste et al., 2011](#)). **Foxl2** es un gen de un solo exón que codifica una proteína de 376 aminoácidos y está altamente conservado entre los vertebrados ([Cocquet et al., 2003](#)). La proteína contiene un dominio de unión a ADN de forkhead y residuo de polialanina de 14 aminoácidos ([Cocquet et al., 2003](#)) **Foxl2** juega un papel importante en el ovario durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta ([Verdin y De Baere, 2012](#)). Estudios recientes han indicado su participación en prácticamente todas las etapas del desarrollo ovárico, se ha reportado que juega un papel muy importante en las

patologías ováricas (Georges *et al.*, 2013). Se requiere **Foxl2** para mantener la identidad de las células de la granulosa en las hembras. La delección de **Foxl2** en ratones adultos conduce a la expresión de marcadores de células de Sertoli y a la aparición de estructuras que recuerdan los túbulos seminíferos (Uhlenhaut *et al.*, 2009). Se ha descrito un fenotipo similar en ratones en los que se eliminan los receptores de estrógeno **Esr1** y **Esr2**, o cuando la producción de estrógenos se deteriora, sugiriendo una sinergia funcional entre los receptores de estrógeno y **Foxl2** en el mantenimiento ovárico (Fisher *et al.*, 1998; Dupont *et al.*, 2000).

1.11 EL OVARIO

El ovario de los mamíferos es un órgano complejo encargado de garantizar el proceso reproductivo. Los ovarios son estructuras pares, fijados a ambos lados del útero por los ligamentos útero-ováricos a la pared pelviana por los infundíbulos pelvianos. La función más importante es la producción de gametos funcionales, a la par con su función endocrina que es crítica ya que la producción de estrógenos es esencial para el desarrollo de los genitales externos, así como la progesterona, es necesaria para el mantenimiento de la gestación. Estas funciones están estrechamente coordinadas con la folículoogénesis el cual es un proceso dinámico que implica una diferenciación continua de tres tipos celulares: el ovocito, las células de la granulosa y de la teca (Georges *et al.*, 2013). Esta diferenciación coordinada se encuentra bajo el control de múltiples señales que incluyen: gonadotropinas (hormona folículoestimulante [**FSH**] y hormona luteinizante [**LH**]), miembros del factor de crecimiento transformante β (**TGF β**), Proteínas (**BMP15**, **BMP4**, **BMP7**, **AMH**, **FST**), factores de crecimiento (**GDF-9**, **IGF1**, **FGF2**, **KIT**) y hormonas sexuales (estradiol, testosterona, progesterona) formando una comunicación estrecha (Edson *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo ovárico, las células germinales se encierran progresivamente dentro de estructuras epiteliales llamadas "cordones ovígeros" constituidos por células pre-granulosa, revestidas por una membrana basal. Al final del desarrollo

ovárico, los cordones ovígeros se fragmentan en folículos primordiales, que son unidades epiteliales constituidas por un ovocito rodeado por una sola capa de células de la granulosa. Los folículos primordiales que son reclutados, inician su crecimiento y desarrollo a folículos maduros por el proceso denominado foliculogénesis, pasando por diferentes etapas foliculares que van de un folículo primordial, primario, secundario, pre-antral, antral y pre-ovulatorio, este proceso es acompañado por la recepción de hormonas esteroides secretadas por el hipotálamo como la **FSH** y la hipófisis que secreta **LH**, formándose una comunicación a través del eje hipófisis-hipotálamo-gónada permitiendo la madurez de los folículos y por consiguiente una función ovárica adecuada, que permite la ovulación, la fertilización y el desarrollo de un nuevo organismo, manteniendo de esta forma la perpetuación de la especie.

Por la estructura morfológica que conforma al ovario, las interacciones celulares que se llevan a cabo entre el ovocito y las células somáticas y la influencia hormonal se estableció que el ovario quedaba dotado de un número finito de células germinales al momento del nacimiento y que una vez llegada la etapa reproductiva, este número disminuía conforme avanzaba la edad hasta desaparecer ([Zuckerman 1951](#)). Sin embargo, una gran diversidad de estudios sugiere que el ovario de los mamíferos adultos no está dotado de un número finito de ovocitos, como se ha dogmatizado por mucho tiempo. Evidencia clásica y actual establece que el ovario adulto de los mamíferos posee células troncales de la línea germinal (GSCs; por sus siglas en inglés) las cuales se auto-renuevan formando una reserva de ovocitos que mantiene un número estable de células germinales. Este concepto, que se contraponen a lo establecido en el dogma de la biología reproductiva, ha generado una gran polémica intensificándose en las últimas dos décadas generando opiniones a favor y en contra de la existencia de un mecanismo de neo-ovogénesis en el ovario adulto de los mamíferos ([Gosden, 2013](#)).

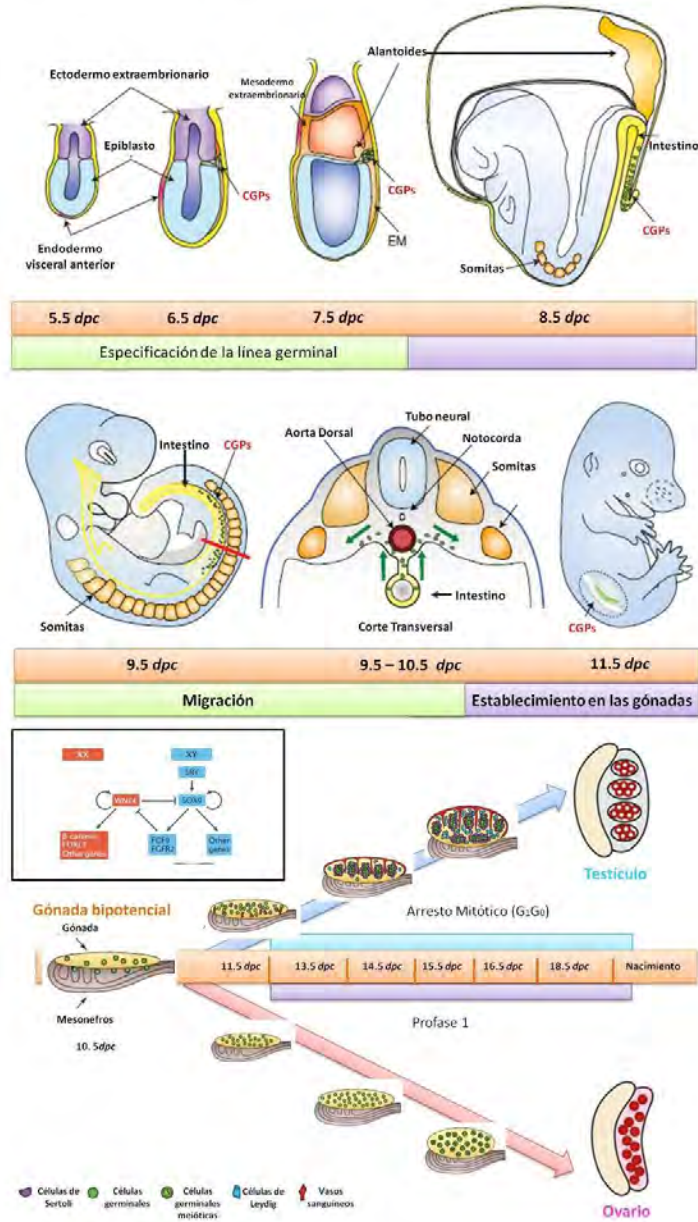


Figura 1. Cronología del desarrollo de las células germinales y el desarrollo gonadal. Las células germinales primordiales (CGPs) se especifican dentro de la línea primitiva a los 7.5 *dpc* e inician su proliferación y migración a través del intestino posterior para colonizar el esbozo gonadal a los 10.5 - 11.5 *dpc*. La gónada bipotencial (amarilla) se forma por un engrosamiento del epitelio celómico del mesonefros (gris) alrededor de los 9.5 y 11.5 *dpc*. El gen *Sry* se expresa en las gónadas XY e inicia la vía de diferenciación testicular *Sry* activa a *Sox9* a los 11.5 y 12.5 *dpc*. *Sox9* activa a *FGF9*, *FGFR2* cuya función principal es bloquear a *Wnt4*. Esta expresión de genes lleva a la diferenciación de las células de Sertoli (púrpura) que encierran a las células germinales (verde) para formar cordones testiculares y a la diferenciación de las células de Leydig (azul) en el intersticio del testículo, por su parte las células germinales entran en arresto mitótico (G1 / G0) a los 12.5 *dpc*. En las gónadas XX *Wnt4* activa la vía de diferenciación femenina a través de β -catenina y *Foxl2*. Sin embargo no se observan cambios morfológicos en la gónada XX hasta 13.5 – 14.5 *dpc* cuando las células germinales inician la profase I de la meiosis. Iniciando con la diferenciación de las células de la granulosa y la formación de folículos primordiales. El arresto del ciclo celular específico de cada sexo se mantiene hasta después del nacimiento. Imagen modificada de: Capel, 2017; Roos y Capel, 2005; Saitou y Yamaji, 2015; Spiller y Koopman 2011.

1.12 DOGMA DE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

Sir Solomon Zuckerman realizó una minuciosa revisión de trabajos publicados en diferentes especies de animales como la rata, el ratón, el mono rhesus, el conejo, el perro, y el humano, y dedicó mucho tiempo contando ovocitos a diferentes edades, de esta forma postuló que el número de ovocitos de cada especie disminuía con respecto al incremento de la edad. Este informe dio lugar a la doctrina básica de la biología reproductiva, argumentando que las hembras de mamíferos durante el desarrollo embrionario generan una reserva limitada de ovocitos (Zuckerman, 1951). La capacidad reproductiva femenina, se define por el número y calidad de ovocitos desarrollados en el ovario durante el período neonatal. La aceptación de este principio se basa en evidencia empírica sobre el mecanismo de formación de ovocitos, que supone la expansión de una población relativamente pequeña de las células germinales primordiales (CGPs) en el período fetal, la cual proporciona una reserva de folículos primordiales al nacer (McLaren 2000 y 2003) y el agotamiento gradual de esa reserva en el ovario adulto por atresia y ovulación conducen a una senescencia reproductiva (Cohen 2004). Ovulaciones posteriores al período reproductivo tienen como consecuencia ovocitos de mala calidad debido a defectos celulares, anomalías cromosómicas y alteraciones funcionales que se acumulan con la edad (Broekmans *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2009).

Sin embargo, a lo largo de los últimos 150 años, este dogma ha sido la base central de polémicos debates entre los científicos ya que existe una corriente alterna, los partidarios de la existencia de un mecanismo de neo-ovogénesis. Estos grupos han sugerido la existencia de células troncales de la línea germinal (GSCs) auto-renovables presentes en el ovario adulto de los mamíferos. Estas evidencias van desde conteos de ovocitos en diferentes etapas del desarrollo que llevan al establecimiento de modelos matemáticos, expresión de marcadores de células troncales, evidencia de proliferación celular, diferenciación *in vitro* y experimentos de trasplante, los cuales apoyan un cambio al paradigma en la biología reproductiva que implica la renovación activa de ovocitos, proceso denominado neo-ovogénesis.

1.13 NEO-OVOGÉNESIS

Han sido bien caracterizadas GSCs, en modelos de invertebrados como la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Spradling *et al.*, 2011) y en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Cinquin *et al.* 2010; Kimble 2011). Dentro del grupo de vertebrados se han caracterizado en dos especies de peces *Danio rerio* (pez cebra) y *Oryzias latipes* (Medaka). En mamíferos se han mostrado evidencia de la existencia de GSCs en prosimios, ratón, humano, mono, cerdos y murciélago.

El grupo de investigación de Jonathan Tilly sugirió que en el epitelio superficial del ovario de ratones adultos existen células troncales de la línea germinal con actividad mitótica. Proponen que la función de estas células es formar una pequeña reserva de células indiferenciadas capaces de auto-renovarse para mantener un número de constante de ovocitos, mecanismo denominado neo-ovogénesis. Estos datos generaron una discusión inmediata e interpretaciones alternativas de los resultados, generando una gran controversia en los conceptos de la biología reproductiva de las hembras. Actualmente la opinión está dividida sobre estas dos afirmaciones, existen opiniones concretas a favor del mecanismo de neo-ovogénesis (Johnson *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; Tilly *et al.*, 2007; Abban y Johnson 2009; Bukovsky *et al.*, 2004) y otra corriente en contra (Byсков *et al.*, 2005; Eggan *et al.*, 2006; Bristol-Gould *et al.*, 2006; Gosden *et al.*, 2009) lo que no ha permitido un consenso para la validación de la neo-ovogénesis debido a las enormes implicaciones que conllevan para la fertilidad y la salud femenina (Porrás y Moreno 2017).

1.14 EL MURCIÉLAGO COMO MODELO DE ESTUDIO

La mayoría de los estudios sobre el origen, especificación, diferenciación y potencialidad de las CGP se han llevado a cabo principalmente en modelos como el ratón, la rata, el conejo y el humano. Sin embargo, para el caso de animales de fauna silvestre como los murciélagos el conocimiento sobre estos mecanismos es prácticamente nulo.

En los murciélagos no se puede hablar de un patrón de reproducción típico debido a que las diferentes especies enfrentan condiciones ambientales variables, por lo que han desarrollado diversas adaptaciones morfológicas e incluso novedosas conductas reproductivas (Rasweiler, 1993). Mucho del éxito reproductivo de los murciélagos, depende de su organización social, que les permite identificarse como individuos y promueve la proximidad de las hembras y machos durante la época de apareamiento. Estos mamíferos pueden formar colonias mixtas o bien segregarse por sexos. Ciertas especies de murciélagos presentan dimorfismo sexual, por lo cual los machos suelen ser más grandes que las hembras o viceversa o haber variaciones en la intensidad de la coloración del pelaje (Crichton, 2000). Algunas especies de murciélagos presentan características similares a las del humano y roedores, lo cual en términos comparativos los quirópteros representan un modelo que puede aportar o ampliar el conocimiento dentro del campo de la biología reproductiva, específicamente de la biología de las CGP y del desarrollo gonadal.

Dentro de este contexto, algunas poblaciones de murciélagos pueden generar descendencia durante todo el año, mientras que otras solamente dos veces por año. Además, solo nace una cría y ocasionalmente dos. El tracto reproductor de las hembras, al igual que el del resto de los mamíferos, consta de dos ovarios, dos oviductos, útero, cérvix y vagina. Sin embargo, dentro de este esquema tradicional se pueden presentar diversas adaptaciones anatómicas y fisiológicas (Wimsatt, 1979). La funcionalidad de los ovarios es variable, y en algunas ocasiones ésta depende de la época del año, disponibilidad de recursos y/o receptividad al macho. Aunque la mayoría de los quirópteros presenta actividad ovárica en ambos ovarios, algunas especies pueden ovular consistentemente desde uno sólo, por lo que el ovario funcional suele ser de mayor tamaño.

La funcionalidad del tracto reproductor masculino en los murciélagos presenta más variabilidad en relación con el de otros mamíferos. Se han descrito diferencias en

relación a la ubicación de los testículos, así como en la postura del órgano copulador. La talla de los testículos de un individuo adulto está relacionada con la espermatogénesis y estos órganos llegan a ser grandes durante el estro postparto de las hembras (Fleming *et al.*, 1972). Sin embargo, la organización de los túbulos seminíferos en la mayoría de los quirópteros presenta la misma estructura que la descrita en mamíferos. Se encuentra constituido por un epitelio germinal conformado por espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, y por espermatidas que dan lugar a espermatozoides (Begueline, 2011; Ruiz-Mar, 2014). Una diferencia notable con otros mamíferos es que la cola del epidídimo puede almacenar espermatozoides por periodos de semanas a meses principalmente es especies que hibernan. Los espermatozoides de los quirópteros son clásicamente de mamíferos con distinciones inter-familia, principalmente en la morfología del acrosoma y la cabeza.

1.15 GENERALIDADES DE LOS MODELOS DE ESTUDIO

1.15.1 Murciélago *Artibeus jamaicensis*



Orden: Chiroptera
Suborden: Microchiroptera
Superfamilia: Phyllostomoidea
Familia: Phyllostomidae
Subfamilia: Stenodermatinae
Género: Artibeus
Subgénero: Artibeus
Especie: ***Artibeus jamaicensis***
(Leach, 1821)

Murciélago zapotero



Descripción morfológica

Artibeus jamaicensis pesa entre 40 y 60 g, alcanza 70 a 85 mm de longitud con una envergadura de 48 a 67 mm de ancho. Tiene pelo corto que es de color pardusco, grisáceo o negro. Las raíces del pelo son blancas, dando un aspecto ligeramente canoso. El pelaje ventral es generalmente más ligero que el pelaje dorsal. Se caracteriza por presentar franjas faciales blancas, una por encima y por debajo de cada ojo. Esta especie carece de una cola externa y el uropatagio desnudo es una característica que no está presente en otros miembros del género. Como en otros filostomidos, los miembros de esta especie tienen una hoja nasal bien desarrollada, amplia, carnosa en forma de lanza. *Artibeus jamaicensis* tiene caninos grandes en relación con otros miembros del género, que se utilizan para anclar la fruta inmadura (Nowak, 1999).



Reproducción

Artibeus jamaicensis es polígamo, los individuos machos defienden harenes de 4 a 18 hembras. Se sabe que los machos de esta especie forman jerarquías estables basadas en tamaños. Los machos más grandes y más pesados defienden con éxito grandes harenes y permanecen con ellos durante varios años. Sin embargo, las hembras se mueven con frecuencia entre los harenes, las hembras solitarias se incorporan a veces en harenes existentes. La reproducción no se limita a los machos dominantes, ya que los machos solteros ocasionalmente copulan con hembras solitarias. (Kunz *et al.*, 1983, Emmons, 1997; Ortega y Arita, 1999).

El ciclo reproductivo de *Artibeus jamaicensis* alterna entre períodos de desarrollo normal y tardío describiéndose como poliétrico bimodal. A finales de marzo o principios de abril, las hembras dan a luz a una sola cría. Inmediatamente después del parto, las hembras entran en un estro posparto y pueden estar gestantes y

lactando al mismo tiempo. Después de un período de gestación de no más de 4 meses, las hembras dan a luz a otra cría alrededor de finales de julio o principios de agosto. Una vez más, el parto es seguido por un estro posparto; sin embargo, el blastocisto resultante se implanta en el útero y se hace inactivo durante 2.5 meses. A mediados de noviembre, el blastocito reanuda el desarrollo y las hembras embarazadas dan a luz a finales de marzo o principios de abril. En raras ocasiones, las hembras dan a luz a gemelos. La investigación sugiere que este patrón de desarrollo retardado sincroniza el nacimiento de los jóvenes con el final de la estación seca, lo que permite que el destete ocurra cuando los frutos grandes están en la disponibilidad máxima. Se observan patrones reproductivos acíclicos en algunas poblaciones de México Central y Colombia. Los ciclos reproductivos son probablemente moderados por la abundancia de alimentos y el calendario de las estaciones húmedas y secas. *Artibeus jamaicensis* vuelan alrededor de los 31 a 51 días después del nacimiento y alcanza el tamaño adulto aproximadamente a los 80 días de edad. (Emmons, 1997, Fleming, 2003, Marques-Aguiar, 2007, Merritt, 2010, Vaughn *et al.*, 2011)



Hábitos alimenticios

Como su nombre común sugiere, los murciélagos jamaicanos se alimentan de frutas son frugívoros y teniendo preferencia por los zapotes y los higos. También consumen polen, néctar, partes de flores e insectos durante la estación seca cuando la fruta es menos abundante. Estos murciélagos pueden viajar hasta 8 km por noche en busca de fruta para comer.



Estatus de conservación

Artibeus jamaicensis es considerado como "preocupación menor" en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN y no tiene ninguna condición especial de acuerdo con la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES) (Miller *et al.*, 2016).

1.15.2 Murciélago *Sturnira lilium*



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

Murciélago de charreteras



Descripción morfológica

Los pequeños murciélagos de hombros amarillos son murciélagos de tamaño mediano con longitudes totales de 62 a 65 mm, longitudes de antebrazo de 36.6 a 45.0 mm, y envergadura promedio de 30 cm (Vieira y Carvalho-Okano, 1994). Los machos tienden a tener una longitud total y mediciones craneales ligeramente mayores que las hembras (Gannon *et al.*, 1989). La masa muscular va de 13 a 18 g (Evelyn y Stiles, 2003). Tienen orejas cortas y anchas, no hay cola. El color varía según el sexo, la edad y geografía. La piel dorsal puede ser de color gris oscuro a rojizo y la piel ventral es siempre más ligera que la piel dorsal. La cabeza, el cuello y los hombros tienen un tinte amarillo debido a los ejes de cabello amarillo y con puntas de color marrón oscuro hacen parecer las correas del uniforme de un soldado, lo que ha dado el nombre común de *Sturnira lilium* como murciélago de charreteras (Gannon *et al.*, 1989).



Reproducción

Los sistemas de apareamiento de *Sturnira liliium* no han sido ampliamente estudiados. Se ha observado que en estos quirópteros la relación entre el tamaño de los testículos y la masa corporal es relativamente baja, lo que sugiere que la competencia entre los machos no es alta. La reproducción de los machos corresponde a la receptividad en las hembras (Fleming *et al.*, 1972) para lo cual secretan un olor fuerte de sus glándulas del hombro para atraer a una compañera. Este olor es lo que da a su pelaje la coloración amarilla en sus hombros (Grzimek, 1990, Fleming *et al.*, 1972, Gannon *et al.*, 1989, Wilkinson y McCracken, 2006).

La información sobre el patrón reproductivo de esta especie es escasa. Jones en 1966 reporta periodos de crianza durante todo el año. Fleming y col (1972) en una comunidad de murciélagos en el Oeste de Costa Rica determino un patrón poliéstrico binomial, donde los picos de preñez se presentan en diciembre y mayo y los de lactancia en febrero y julio. Taddei en 1976 sugiere que en Brasil se presentan dos periodos de gestación, uno en junio-julio que culmina con nacimientos en octubre y noviembre y el otro en los meses de noviembre-diciembre con nacimientos en febrero y marzo. Finalmente Wilson (1979) tomando en cuenta esta información reporta a la especie *S. liliium* como poliéstrica binomial, reproduciéndose dos veces al año, una vez en la estación seca y una vez en la estación de lluvias. La duración exacta de la gestación es desconocida, la longitud de gestación en otros phyllostomidses de cuatro a siete meses (Grzimek, 1990). Las hembras dan a luz a una cría, pero los nacimientos ocurren dos veces al año, una vez hacia el final de la estación seca y una vez en la mitad de la temporada de lluvias tardías (Stoner, 2001). Los biólogos discuten si este patrón de parto estacional es provocado por la disponibilidad de alimentos o señales de temperatura (Mello *et al.*, 2008).



Hábitos alimenticios

Los organismos de *S. liliium* son frugívoros. Prefieren comer frutas de plantas de la familia de las Solanáceas. Cuando no están disponibles o son poco abundantes, estos murciélagos complementan su dieta con frutas de la Piperaceae y Cecropiaceae (Mello *et al.*, 2008). Ocasionalmente beben néctar, empiezan a alimentarse al anochecer y tienden a forrajear en el sotobosque (Evelyn y Stiles, 2003). Buscan alimentos en arbustos y árboles bajos, pero también forrajean a nivel de dosel. Pueden consumir varias frutas en un período de tiempo de 5 a 15 minutos.



Estatus de conservación

El murciélago filostómido *S. liliium* tolera y se adapta bien a la deforestación en comparación con otras especies de quirópteros. Es la especie de murciélago más abundante en áreas forestales perturbadas. Ni la Lista Roja de la UICN, ni la Lista Federal de los Estados Unidos ni el CITES sugieren que *Sturnira liliium* sea una especie en peligro (Velazco y Patterson, 2017).

2. JUSTIFICACIÓN



El orden Rodentia (ratones y ratas), se ha utilizado como el modelo más común para estudiar la biología de las células progenitoras de la línea germinal y el desarrollo gonadal en mamíferos. Sin embargo, aunque el conocimiento adquirido en este orden es de gran valor, es importante considerar que los roedores presentan toda una serie de adaptaciones reproductivas y de desarrollo. Es decir, que un cuadro completo del desarrollo de la línea germinal en mamíferos no puede obtenerse estudiando una o dos especies dentro de un solo orden.

Entre los mamíferos, los murciélagos ocupan el segundo orden más diverso en cuanto a especies se refiere (solo después de Rodentia), y en la actualidad los especialistas coinciden en afirmar que existen más de mil especies alrededor del mundo. En México contamos con una gran riqueza de quiropterofauna, 140 especies, agrupadas en ocho familias, siendo la familia Phyllostomidae la de mayor biodiversidad (55 *spp*). Dentro de esta familia no se puede hablar de un patrón de reproducción típico debido a la notable variedad de gremios tróficos, así como por sus adaptaciones morfológicas e incluso novedosas conductas reproductivas que presentan sus miembros. A pesar de que el conocimiento sobre los patrones reproductivos en varias especies de murciélagos es extenso, mecanismos de determinación y diferenciación gonadal, así como de auto-renovación celular específicamente neo-ovogénesis y espermatogénesis son prácticamente nulos.

Considerando las características morfo-funcionales del tracto reproductor de algunos murciélagos filostómidos, y las similitudes que éstos presentan con los humanos y roedores, en términos comparativos representa un buen modelo de estudio. Además, dentro del filo de los mamíferos los quirópteros exhiben una

amplia variedad de características en los ovarios y testículos que son inusuales. Dentro de este contexto, los embriones de las especies de murciélagos *A. jamaicensis*, y *S. liliium* al igual que en la mayoría de los mamíferos, determinan su sexo por la presencia de cromosomas sexuales heteromorficos y desarrollan una gónada indiferenciada bipotencial que posteriormrnte dara origen a un ovario o a un testículo. Por lo que resultaría importante conocer algunos aspectos relacionados con los mecanismos de determinación y diferenciación sexual gonadal, así como del compromiso de las CGPs en la formación de ovocitos y espermatogonias en estos quirópteros y correlacionarlos con lo descrito en otros modelos.

Los murciélagos, también por sus patrones reproductores, pueden utilizarse como modelo para extender el conocimiento sobre la auto-renovación de la línea germinal en el ovario adulto. Nuestros recientes hallazgos sobre la presencia de células germinales corticales adultas (CGCA), las cuales exhiben características de células progenitoras de la línea germinal semejantes a las descritas en otros mamíferos, ofrece la oportunidad de ahondar en el conocimiento sobre la existencia de un mecanismo de auto-renovación folicular en mamíferos, que resultaría de gran interés tratándose de especies de fauna silvestre que constituyen una parte importante de la biodiversidad de nuestro país.

Durante los últimos años se han desarrollado diversas estrategias metodológicas para dilucidar si un mecanismo de auto-renovación de la línea germinal toma lugar en los ovarios y testículos adultos de los mamíferos. Hasta el momento, no se han desarrollado métodos que lleven a establecer estos eventos en organismos de fauna silvestre, con excepción de algunas técnicas celulares y moleculares establecidas en nuestro grupo.

3. PREGUNTAS A CONTESTAR



Con base en la poca información disponible sobre los mecanismos morfológicos y moleculares de la diferenciación sexual gonadal nos preguntamos si:



¿La ruta de migración de las células germinales primordiales en murciélago es similar a la de humanos y ratón?



¿Los mecanismos de formación, establecimiento y diferenciación gonadal en los murciélagos filostómidos son semejante a lo descrito en otros mamíferos?



¿Los genes **Sox9** y **Mis** están relacionados con la morfogénesis testicular?

Considerando la información disponible sobre un posible mecanismo de neo-ovogénesis en mamíferos y el hallazgo de las CGCA en los murciélagos:



¿Podrían las células identificadas en la región cortical corresponder a células progenitoras de la línea germinal?

4. HIPÓTESIS



1. La dinámica de las células germinales primordiales y los cambios estructurales que conducen al desarrollo testicular y ovárico en el murciélago filostómico *Sturnira lilium* son semejantes a los descritos en otros mamíferos.
2. Las Células Germinales Corticales Adultas (CGCA) corresponden a células progenitoras de la línea germinal, las cuales estarían contribuyendo a la renovación folicular en el ovario adulto del murciélago filostómico *Artibeus jamaicensis*.

5. OBJETIVOS



5.1 OBJETIVOS GENERALES:

1. Determinar los eventos relevantes de la morfogénesis gonadal y su correlación con el desarrollo embrionario, así como describir el patrón de expresión de los genes **Sox9**, **Mis**, y **Ddx4** durante la diferenciación sexual del murciélago filostómico *Sturnira lilium*.
2. Establecer el grado de diferenciación y el compromiso de las Células Germinales Corticales Adultas (CGCA) presentes en los ovarios del murciélago filostómico *Artibeus jamaicensis*.

5.2 OBJETIVO PARTICULARES:

1. Dilucidar la dinámica de las células germinales primordiales durante la morfogénesis gonadal en el murciélago filostómico *Sturnira lilium*.
2. Establecer el inicio de la diferenciación morfológica de la gónada hacia un ovario o un testículo
3. Correlacionar el estadio del desarrollo embrionario con los cambios morfológicos que llevan a la diferenciación testicular y ovárica en *Sturnira lilium*.
4. Demostrar *in situ* la proliferación de las CGCA en el ovario del murciélago *Artibeus jamaicensis*.
5. Aislar las CGCA identificadas en la región cortical de ambos ovarios.
6. Evaluar el comportamiento de las CGCA al interaccionar *in vitro* con células somáticas de ovarios y testículos relacionados y no relacionados.

6. MATERIALES Y METODOS



6.1 SITIOS DE COLECTA

Los ejemplares fueron colectados en horas crepusculares en los municipios de Yautepec y Tepoztlán ubicados en la parte norte del estado de Morelos (Figura 2).

Yautepec está ubicado en las coordenadas geográficas $18^{\circ} 53'$ de latitud norte y $99^{\circ} 04'$ de longitud este con una altura a nivel del mar de 1,210 metros. Por sus condiciones ambientales y geográficas representa un buen sitio de colecta para los murciélagos neotropicales, ya que presenta una temperatura media de 22.7°C con clima cálido subhúmedo y lluvias en verano, con precipitación pluvial anual de 945.7 milímetros anuales. La flora que presenta está constituida principalmente por selva baja caducifolia, de clima cálido: jacaranda, casahuate, ceiba, bugambilias y árboles frutales.

Tepoztlán se localiza geográficamente al norte a una latitud de $19^{\circ}05'21''$, al sur a $18^{\circ}53'45''$, al este a una longitud de $99^{\circ}00'52''$ y $99^{\circ}11'36''$ al oeste. El municipio de Tepoztlán ocupa un área montañosa y otra plana, da lugar a 7,265 hectáreas de bosque, perteneciente al parque nacional "El Tepozteco". Presenta climas semicálido, húmedo y templado, con ambiente subhúmedo en las laderas de la sierra de Tepoztlán. La época de lluvia es en el verano y a principios de otoño, las precipitaciones más bajas llegan hasta los 1000 mm anuales y las más altas sobrepasan los 1200 mm anuales. Por presentar diferentes climas sostiene diferentes ecosistemas en los que existen diferentes especies de animales y vegetales de gran importancia. Se destacan las especies del género *taxidium* (sauces, amates y ahuehuetes), así como árboles frutales ciruela, zapote, café, guayabo por mencionar algunos. Estas características le brindan a los murciélagos

filostómidos las condiciones de ambiente, hábitat y, alimentación adecuadas para su desarrollo.

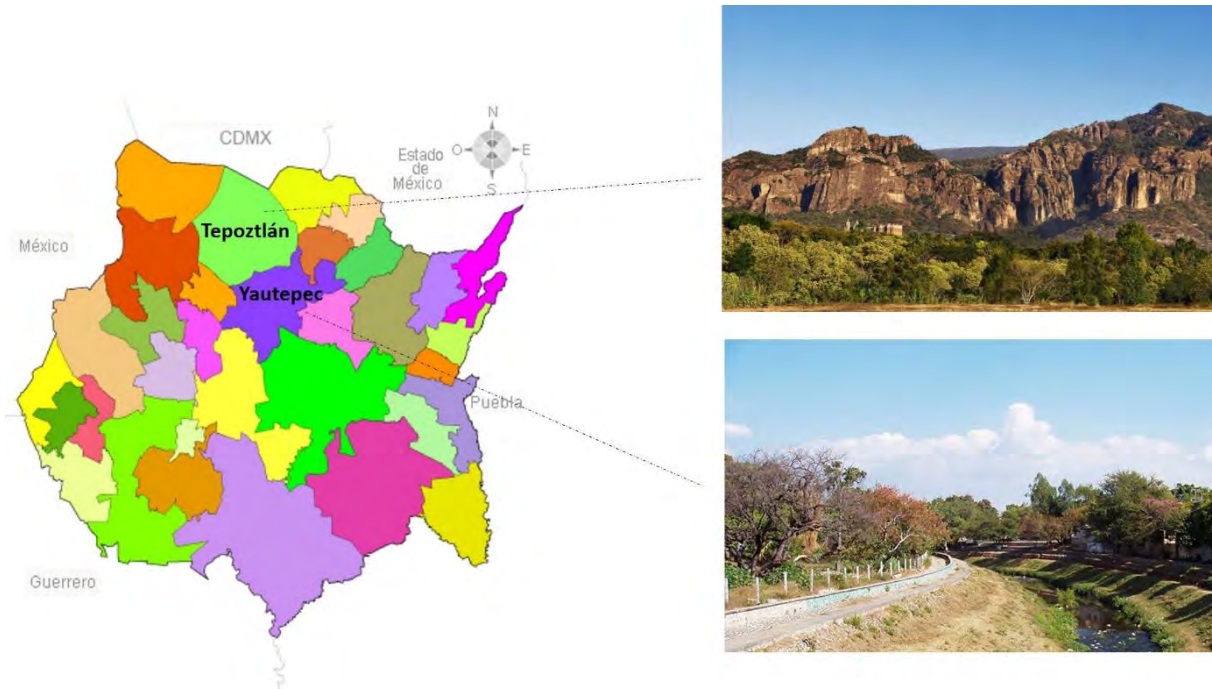


Figura 2. Mapa geográfico que muestra la ubicación del Municipio de Yautepec y Tepoztlán.

6.2 COLECTA DE MURIÉLAGOS FILOSTÓMIDOS

Se utilizaron hembras preñadas de la especie *Sturnira lilium*, determinando la gestación por palpación y por la presencia de glándulas mamarias desarrolladas. También se emplearon hembras adultas de la especie *Artibeus jamaicensis*, distinguiéndolas por presentar una osificación completa de las placas de crecimiento de la epífisis de la cuarta articulación metacarpal falángica.



Figura 3. Colecta de murciélagos utilizando redes de niebla.

Los organismos fueron colectados mediante el uso de redes tipo niebla colocadas entre la vegetación para camuflajearse en horas crepusculares (Figura 3). Las especies de murciélagos fueron identificadas por sus características morfológicas en base a las claves taxonómicas establecidas por [Medellin](#) y colaboradores (2008).

Los murciélagos se colocaron en sacos de tela para su transporte al Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM. Se realizaron un total de 18 colectas, obteniendo un total de 36 hembras gestantes de *Sturnira liliium* y 44 hembras adultas de *Artibeus jamaicensis* (Tabla 1).

Las colectas se realizaron abarcando las cuatro estaciones del año siguiendo los lineamientos de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y los estatutos de la Dirección General de Vida Silvestre la cual otorgo los permisos para colecta con números de registro SGPA/DGVS/09713/13, SGPA/DGVS/10841/14, SGPA/DGVS/12332/15, SGPA/DGVS/12149/16 y SGPA/DGVS/00264/17.

Tabla 1. Fechas de colecta y número de individuos colectados

Fecha colecta	<i>Artibeus jamaicensis</i>	<i>Sturnira lilium</i>
8 de febrero 2013	0	2
14 de junio 2013	2	3
12 noviembre 2013	3	2
12 de mayo 2014	1	2
28 de agosto 2014	4	2
16 de octubre 2014	1	3
19 de enero 2015	2	3
30 de julio 2015	3	3
20 de agosto 2015	0	2
28 de agosto 2015	5	1
13 de enero 2016	3	3
29 de Marzo 2016	3	1
27 de abril 2016	0	2
31 de agosto 2016	3	1
12 de marzo 2017	1	1
05 de mayo 2017	5	1
24 de junio 2017	0	1
29 de octubre 2017	8	3
Total de organismos	44	36

6.3 USO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO (RATONES)

Se utilizara una colonia de ratones transgénicos de la cepa B6B5/EGFP que acarrea la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en ingles). Los ratones fueron mantenidos en la Unidad de Modelos Biológicos, sede 3 del circuito escolar. Los animales se alojaron en cajas de poliestireno con una cama de

aserrín, la cual se cambió cada tercer día para su bienestar. Los animales fueron alimentados *ad libitum* y agua la cual fue acidificada y esterilizada mediante autoclave. Se mantuvieron con una ventilación de 15 a 20 recambios de aire por hora para controlar la humedad, calor y liberación de gases tóxicos, así como a una temperatura que osciló entre los 20 y 25°C y una humedad relativa ambiental entre 40 y 70%. Permanecieron con una iluminación de 12 horas luz/12 horas oscuridad, para la regulación del ciclo estral y reproductivo.

Al igual que los murciélagos el cuidado y uso de los animales de experimentación se realizó bajo los estatutos de la norma oficial mexicana 062 (NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y el uso de animales de laboratorio). Así como por las normas éticas de experimentación establecidas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM y el CICUAE (Subcomité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación).

6.4 SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

6.4.1 Embriones de murciélago

Las hembras gestantes de la especie de murciélago *Sturnira lilium* fueron sacrificadas administrando una sobredosis de pentobarbital sódico (0.7 mL por cada 20g; SEDAL-VET). Los estadios de desarrollo embrionario se determinaron siguiendo el sistema descrito por [Cretecos et al., \(2005\)](#) enfocándose en las características morfológicas y en el desarrollo del esbozo de las extremidades anteriores. Los embriones se disecaron del tracto reproductor de la hembra, removiendo el tejido de la decidua y las membranas extraembrionarias, incluyendo el saco vitelino y el amnios. Una vez clasificados, los embriones se procesaron para análisis subsecuentes. Una gónada de cada embrión se empleó para el análisis morfológico por microscopía de campo claro y electrónica, mientras que la gónada contralateral se procesó para el análisis de la proteína de los genes ***Ddx4***, ***Sox9*** y ***Mis*** por inmunofluorescencia.

6.4.2 Ovarios de hembras adultas

Hembras adultas de la especie *Artibeus jamaicensis* fueron pesadas en una balanza granataría y se les realizó un frotis vaginal para determinar por citología la etapa del ciclo estral en el que se encontraban. Los ejemplares se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico (0.7mL/20gr de peso SEDAL-VET). Una vez sacrificadas se colocaron bajo el microscopio estereoscopio realizando una incisión sobre la parte abdominal del animal retirando las vísceras para localizar el tracto reproductor femenino, el cual fue retirado para disecar los ovarios derecho e izquierdo del animal para su posterior procesamiento.

6.5 IDENTIFICACION DEL SEXO DE LOS EMBRIONES

6.5.1 Presencia del corpúsculo de Barr

En los embriones en donde no fue posible distinguir el sexo gonadal, este fue establecido por la presencia o ausencia del corpúsculo de Barr, el cual corresponde al cromosoma X inactivado en las hembras. El corpúsculo de Barr fue examinado en los núcleos de las células amnióticas ([Palmer y Burgoyne, 1991](#)). Para esto, se obtuvo el amnios de cada embrión y se fijó en una solución 1:1 de ácido acético metanol (JT Baker) durante 5 min. La muestra se centrifugó a 1000 rpm retirando el sobrenadante. Al botón celular resultante se le adicionó una gota de ácido acético al 60% y se disgregó mecánicamente hasta obtener los núcleos en suspensión. Finalmente los núcleos se colocaron sobre una laminilla y se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se montaron en medio acuoso para su observación al microscopio óptico (Nikon, Eclipse E200).

6.6 INMUNOFLUORESCENCIA EN GÓNADAS DE MURCIÉLAGO

Inmediatamente después de su disección, las gónadas se fijaron en paraformaldehído (PFA; 4%/PBS 1X, pH 7.1) durante 25 min, se lavaron con PBS 1X por 5 min y se colocaron en sacarosa al 30% en PBS (Sigma, Aldrich) a 4°C durante toda la noche. Las muestras se embebieron en medio de montaje óptimo para cortes en frío (OCT; Tissue-Tek, Sakura Finetek Torrance, CA, USA) y se congelaron en hexano (JT Baker) a -70°C. Posteriormente se obtuvieron cortes de 20 µm en un criostato (Leica CM 1850).

La técnica de inmunofluorescencia se realizó siguiendo lo previamente descrito por [Moreno-Mendoza et al \(2004\)](#). Brevemente, los cortes se trataron con Tritón X-100 (1% en PBS) durante 10 min, se lavaron con PBS 1X y bloquearon durante 2 horas con albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Aldrich) al 1%. Los cortes se incubaron por separado con anticuerpos policlonales (Tabla 2) contra las proteínas **DDX4** (1:500; Abcam ab13840), **SOX9** (1:250; Millipore AB5535) y **MIS** (1:250; SantaCruz sc-6886) diluidos en albúmina 1% durante toda la noche a 4°C. Después se lavaron con PBS 1X y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 3) anti-conejo IgG Rodaminado (Calbiochem 401321), anti-conejo Cy3 (LifeTechnology A10520) y anti-conejo Cy5 (LifeTechnology A10523) diluidos 1:200 en albúmina por 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección simultánea de las proteínas **SOX9** y **MIS**, las secciones se fijaron nuevamente con PFA 4% durante 15 minutos, se bloquearon dos horas con BSA 1% y se repitieron los pasos de incubación antes mencionados con los anticuerpos primarios y secundarios. Finalmente, las secciones se montaron en medio para fluorescencia permanente (Dako™) y guardaron a 4°C para su análisis en el microscopio confocal (LSM 5 Pascal; Carl Zeiss, Jena, Germany), equipado con láseres de Argón-Kriptón y Helio-Neón y con filtros BP 450-490 y 546/12.

6.7 MICROSCOPIA DE LUZ Y ELECTRONICA EN GÓNADAS DE MURCIÉLAGO

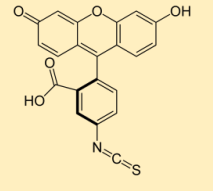
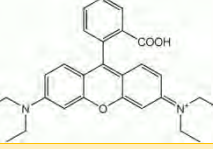
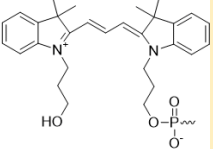
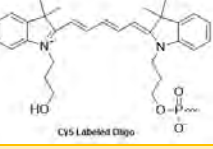
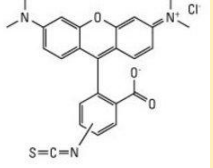
Las gónadas se fijaron en solución de Karnovsky (Karnovsky, 1965) durante 24 horas a 4°C para posteriormente ser incubadas en buffer de cacodilatos (0.1M a pH 7.4) por 24 horas a 4°C. Los tejidos se post-fijaron en tetraóxido de osmio (OsO₄) durante 1 hora y se deshidrataron en soluciones graduales de etanol (70-100%). A continuación se colocaron en acetonitrilo y se impregnaron de manera gradual con la resina epóxica Epón empleando diluciones 1:1 y 2:1 de EPÓN-Acetonitrilo. Finalmente las muestras se incubaron en Epón puro durante 24 hrs. Y se polimerizaron en bloques de plástico a 60°C durante 24 horas.

De cada muestra se obtuvieron cortes semifinos de 1µm de espesor y se tiñeron con azul de toluidina para su observación al microscopio de luz. También se obtuvieron cortes finos de 60-90 nm de grosor, se montaron sobre rejillas de cobre con un diámetro de 3 mm y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación al microscopio electrónico de transmisión (JEOL-JEM-1010).

Tabla 2. Anticuerpos primarios

ANTICUERPO	DILUCIÓN	ANFITRIÓN	COMPAÑÍA
Sox9	1:200	Conejo	Millipore (AB5535)
Mis	1:200	Cabra	SantaCruz (sc-6886)
Fosfatasa alcalina (FA)	1:200	Conejo	Sigma (A9811)
Laminina	1:200	Conejo	Abcam (ab11575)
Conexina 43 (CX43)	1:200	conejo	Sigma (C6219)
Stella	1:200	Conejo	Abcam (19878)
Ddx4	1:200	Conejo	Abcam (13840)
Fosfo-Histona 3 (pH3)	1:200	Conejo	Millipore 06-570
Ki-67	1:100	Conejo	Biocare medical CRM325A
PCNA	1:200	Conejo	Anaspec 55421

Tabla 3. Anticuerpos secundarios (fluorógenos)

FLUOROFORO	CLASE	ANFITRION E ISOTIPO	EXCITACIÓN (nm)	EMISIÓN (nm)	Compañía y No. Catalogo
FITC (Fluorescein) 	Policlonal	Rabbit anti-Goat IgG (H&L)	493	528	ABCAM (ab6737)
Rodamina 	Policlonal	IgG	547	572	Calbiochem (401321)
CY3 (Cyanine 3) 	Policlonal	Goat Anti-Rabbit IgG (H&L)	512-552	565 y 615	ThermoFisher scientific (A10520)
CY5 (Cyanine 5) 	Policlonal	Goat Anti-Rabbit IgG (H&L)	625-650	670	ThermoFisher scientific (A10523)
TRITC (5/6-tetramethyl-rhodamine isothiocyanate) 	Policlonal	Anti-mouse	552	575	Zymed

6.8 PROLIFERACIÓN CELULAR EN OVARIOS ADULTOS DE MURCIÉLAGO

6.8.1 Inmunodetección de phospho-H3, Ki-67 y PCNA

Los ovarios adultos de murciélago se fijaron inmediatamente de su obtención con Paraformaldehído al 4% (Sigma) durante 15 min, seguido de un lavado de 5 min en PBS 1X y posteriormente se colocaron en sacarosa al 30% durante toda la noche a 4°C. Los tejidos se incluyeron en capsulas de Beem con Tissutek

orientando las muestras para cortes transversales y congelándolos en hexano frío. Se realizaron cortes seriados de 14 µm de espesor en un criostato, los cuales se colocaron en laminillas Superfrost-plus (EMS), y se colocaron en vacío durante 1 hora.

Se realizó un lavado con PBS 1X durante 10 min, y los cortes se permeabilizaron con Tritón X-100 por 10 min. Posteriormente se lavaron con PBS 1X y cada laminilla se incubó durante 2 horas con albúmina al 1% en PBS 1X. A continuación se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 2): **pH3** (Millipore 06-570), **Ki-67** (Biocare medical CRM325A) y **PCNA** (Anaspec 55421) en una dilución 1:100 en albúmina al 1% en PBS toda la noche a 4°C. Después se realizaron cuatro lavados con PBS 1X (5 min. cada uno), se bloqueó con albúmina 1% durante 15 min y se colocó el anticuerpo secundario anti-conejo Cy3 (Life Technologies A10520) a una dilución de 1:100 en albúmina al 1% en PBS una hora a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados con PBS 1X (5 min cada uno) y finalmente los cortes se montaron en solución acuosa (Dako). Se visualizaron en el microscopio confocal láser (LSM Pascal, Zeiss. Argón-Criptón y Helio-Neón). Se utilizó el filtro BP 546/12 (TRITC-Rodamina).

6.8.2 Incorporación de la 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU)

Para marcar a las hembras adultas de murciélago de la especie *Artibeus jamaicensis*, se inyectó intraperitonealmente una dosis de 50mg/kg de peso de **BrdU** (Roche) diluido en 200µl de PBS más 200µl de Dimetil sulfoxido (EMS). El animal se mantuvo en exposición a la **BrdU** por dos horas. Transcurrido el tiempo se hizo el sacrificio para la obtención de los ovarios e intestino como control positivo. Los tejidos se embebieron en medio de montaje óptimo para cortes en frío (OCT, Tissue teck) y se realizaron cortes seriados de 20 µm.

Se utilizó el kit 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling Detection Kit I (Roche, 11 296 736 001), para identificar la expresión de la **BrdU**. Las laminillas se sometieron a

un baño con washing buffer por 5min a temperatura ambiente. Se pasaron a una solución de alcohol ácido al 70% por 30 min a -20°C, se lavaron con washing buffer e incubaron con el anticuerpo primario anti-**BrdU** (Roche) en una dilución 1:50 en buffer de incubación durante una hora a 37°C. Posteriormente se lavaron y se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón rodaminado (TRICT) a una dilución de 1:100 durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados con washing buffer de 5min cada uno y se montaron en medio acuoso Dako. Finalmente se visualizaron en el microscopio confocal láser (LSM Pascal, Zeiss. Argón-Criptón y Helio-Neón). Se utilizó el filtro BP 546/12 (TRITC-Rodamina).

6.8.3 Doble inmunomarcaje Ddx4/BrdU

Los tejidos se fijaron con Paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 20min. Se incubaron con sacarosa al 30% en PBS 1X y se embebieron en medio de montaje óptimo para cortes en frío (OCT, Tissue teck) congelándolos con hexano frío a -70°C. Los cortes de ovario derecho, izquierdo e intestino se colocaron en laminillas superfrost-plus (EMS). Los cortes se trataron con X-100 (1% en PBS) por 10 min, se lavaron con PBS 1X se incubaron con el anticuerpo primario anti-**Ddx4** (abcam ab13840) durante 24 y se incubaron con albumina 1% en PBS a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente horas a 4°C. A continuación, se lavaron con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Cy5 (1:100, Life technologies A10523) durante una hora a temperatura ambiente.

Para la detección simultánea de la **BrdU**, las secciones se colocaron en cajas Coplin de vidrio para bañarlas con Pepsina (4mg/mL) en HCl 0.01N en PBS 1X durante 20 min, seguido de un baño con HCl 2N en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron en Buffer de Borato de Sodio (Na₂B₄O₇·10H₂O) 0.1M a pH 8.5 por 10 min a temperatura ambiente y se realizó un lavado con PBS 1X. Después se bloqueó con albumina 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente e incubo con el anticuerpo primario anti-BrdU diluido

1:60 (Roche), durante 24 horas a 4°C. Entonces se incubó el anticuerpo secundario rodaminado (TRICT) anti-mouse a una dilución de 1:100 durante una hora a temperatura ambiente para finalmente montar las secciones con medio permanente para fluorescencia (Dako). Las observaciones se realizaron en la unidad de microscopia del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en un microscopio confocal láser (LSM Pascal, Zeiss. Argón-Criptón y Helio-Neón), utilizando los filtros BP 546/12 (TRITC-Rodamina) y LP 650 (Cy5).

6.9 PURIFICACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES CORTICALES ADULTAS (CGCA)

Una vez disectados los ovarios fueron colocados en portaobjetos trascinados donde se realizó una disgregación mecánica para posteriormente incubar los ovarios en una solución de disgregación (tripsina 0.25% + 0.1mM de EDTA + 1.6mg/mL de hialuronidasa + 20µg/mL de DNAsa en solución Rinaldini) durante 20 min a 37°C en condiciones de ambiente húmedo y 5% de bióxido de carbono. Las enzimas se inactivaron con suero bovino fetal 10%, y los disgregados celulares de ovario obtenidos se mantuvieron en medio de cultivo McCoy suplementado con 10% de suero bovino fetal, 200 U/ml de penicilina y 200 U/ml de estreptomycin. Una vez obtenidas las células disociadas estas se incubaron 1 hora a 4°C con 40µL del anticuerpo primario anti-fosfatasa alcalina (Sigma A9811). Posteriormente se lavaron con una solución de PBS 1X + 20µg/mL de DNAsa, para ser incubadas con el anticuerpo secundario el cual está acoplado a perlas magnéticas (Microbeads, Miltenyi). Después de la incubación, la suspensión celular se hace pasar por una columna unida a un magneto, donde se espera que las CGCA que tienen acopladas las esferas queden pegadas al magneto, y las células somáticas y no afines al anticuerpo primario pasen por la columna teniendo así dos fracciones: una enriquecida de células positivas al anticuerpo (presumiblemente CGCA) y una enriquecida de células no positivas al anticuerpo (presumiblemente células somáticas) (Figura 4).

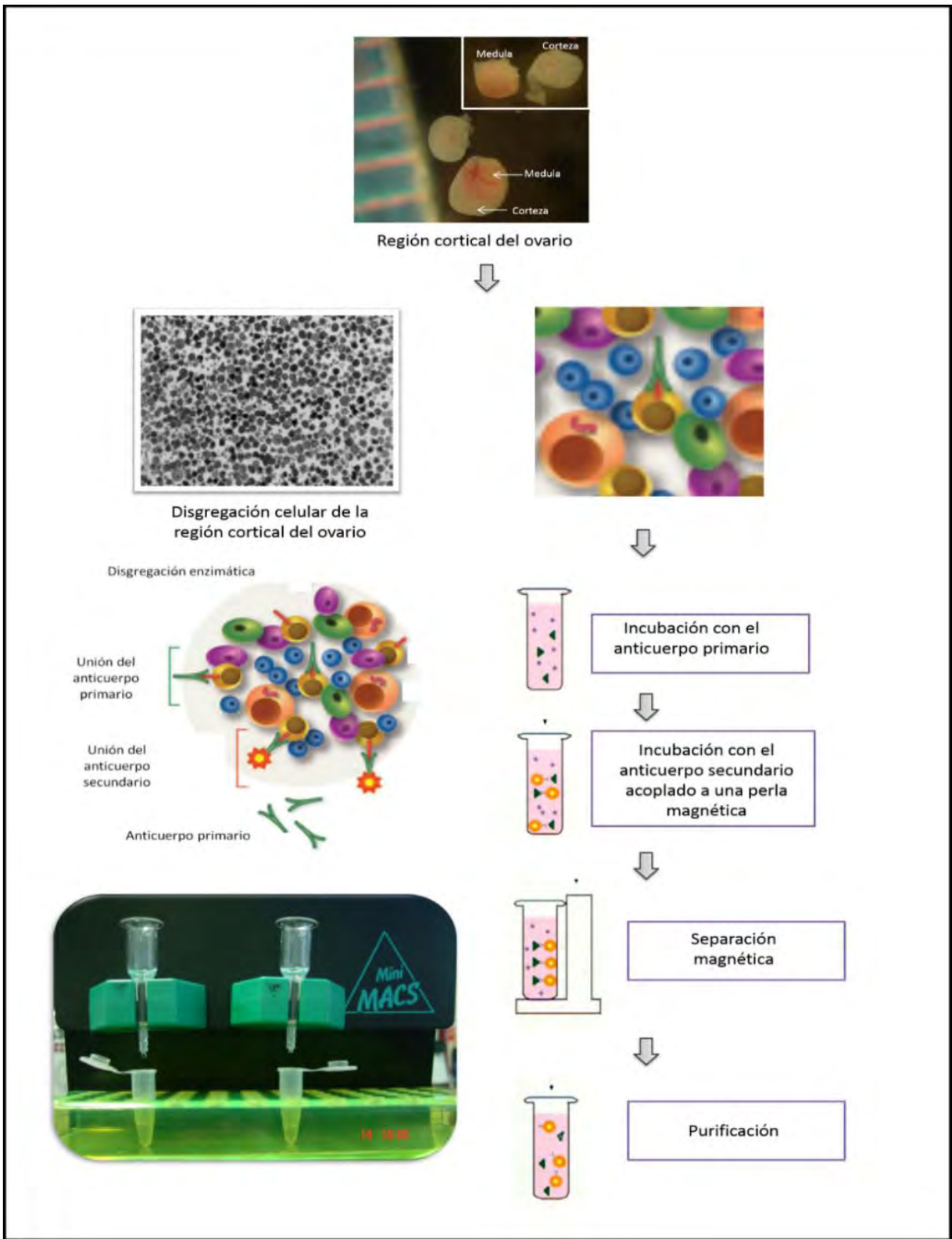


Figura 4. Metodología para el aislamiento de CGCA

6.10 DISGREGADOS-REAGREGADOS (DR)

Tanto ovarios de ratón como de murciélago se disgregaron en una solución de tripsina 0.25% más 0.1mM de EDTA, 1.6mg/mL de hialuronidasa y 20µg/mL de DNAsa en solución Rinaldini. Una vez disociados los tejidos, se mezclaron y se centrifugaron. El botón celular resultante se colocó sobre una membrana transparente (nucleopore) flotando sobre 0.5 mL de medio de cultivo McCoy 5^a modificado, 10% de suero bovino fetal, 200 U/ml de penicilina y 200 U/ml de estreptomicina. Los órganos suspendidos en el filtro se colocaron en placas de cultivo a 37°C mantenidas en condiciones de ambiente húmedo y 5% de bióxido de carbono, monitoreándolas para evidenciar su evolución (Figura 5).

La caracterización de los cultivos celulares se realizó mediante un análisis de la expresión de las proteínas **LAMININA** anti-conejo (ab11575), **CONEXINA-43** anti-conejo (Sigma C6219), **(PH3)** anti-conejo (Millipore 06-570), **DDX4** anti-conejo (ab13840), **STELLA** anti-conejo (ab19878). Y se utilizaron los anticuerpos secundarios Cy3 anti-conejo (Life Technologies A10520).

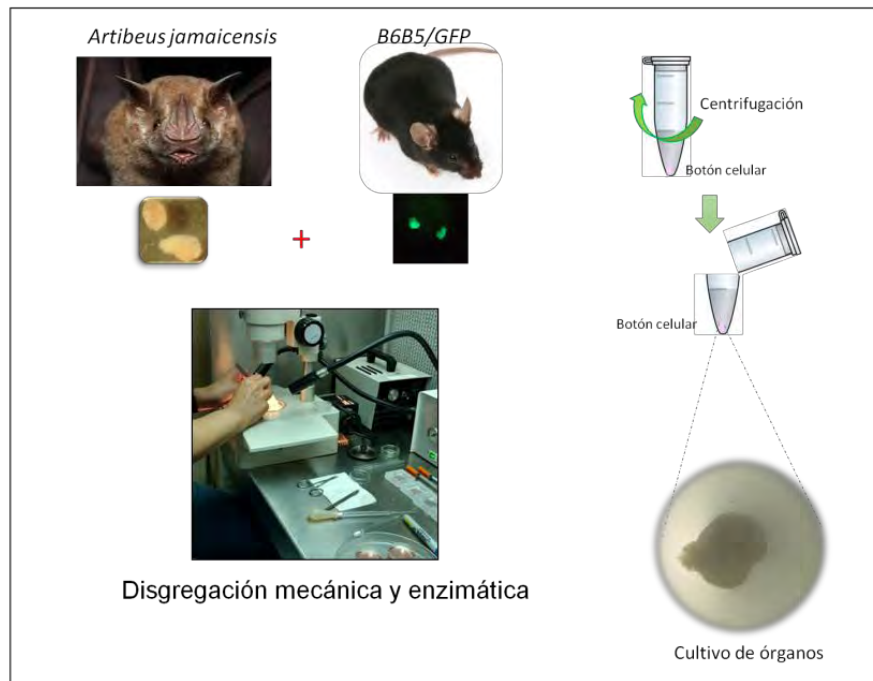


Figura 5. Metodología de disgregación reagregación (DR)

7. RESULTADOS



7.1 Establecimiento de las etapas de desarrollo

Con base en los criterios embrionarios sobre el desarrollo de los miembros anteriores establecidos por [Cretokos y col \(2005\)](#) reportados para el murciélago frugívoro *Carollia perspicillata*, se identificaron 16 etapas del desarrollo embrionario en el murciélago filostómidos *Sturnira lilium* (etapas: 11 y de la 14-26), de las cuales se obtuvieron embriones de ambos sexos.

En la figura 6 se muestran 8 de las 16 etapas. En las cuales se evidencia los estadios críticos de la morfogénesis gonadal descritos en otros mamíferos como el ratón y el humano. El estadio 11 (**E11**) fue determinado por el número de somitas contabilizando 13 pares, mientras que en los estadios del 14-28 se establecieron tanto por el número de somitas como por el grado de desarrollo de los miembros anteriores.

A grandes rasgos podemos resumir que los estadios críticos de la morfogénesis gonadal son:

- ✦ En el estadio 11 (**E11**): Migración de las células germinales primordiales (CGPs).
- ✦ En el estadio 14 (**E14**): Establecimiento de la gónada indiferenciada.
- ✦ En el estadio 17 (**E17**): Inicio de la diferenciación morfológica de la gónada masculina
- ✦ En el estadio 19 (**E19**): Se identificaron las primeras células germinales en meiosis dentro del ovario.

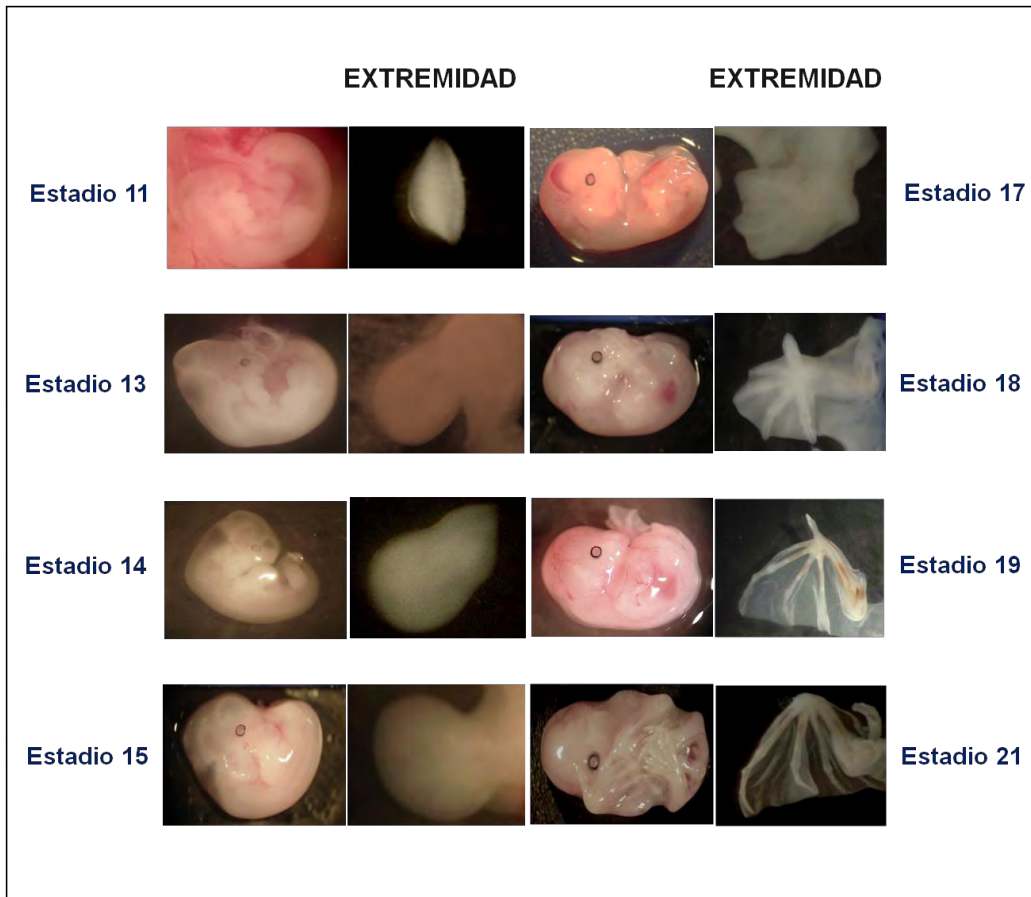


Figura 6. Etapas principales del desarrollo embrionario de *Sturnira lilium* relacionadas con los eventos más relevantes de la morfogénesis gonadal y su correlación con el desarrollo morfológico de las extremidades anteriores: St11 migración de las CGPs a través del mesenterio dorsal; St13-St15 Establecimiento de la gónada indiferenciada; St17 comienzo de la diferenciación morfológica de la gónada; y St18-St21 diferenciación testicular y ovárica.

7.2 Determinación del sexo cromosómico

En etapas tempranas del desarrollo, cuando no fue posible distinguir morfológicamente el sexo gonadal, el sexo cromosómico de los embriones se determinó por presencia o ausencia de la cromatina sexual en células amnióticas. Los núcleos obtenidos del amnios de embriones en los estadios 14 al 16 presentaron o no el corpúsculo de Barr, el cual corresponde al cromosoma X inactivo en las hembras. En este caso, la presencia del 80% o más de núcleos con cromatina sexual en un campo correspondió a embriones XX (Figura 7).

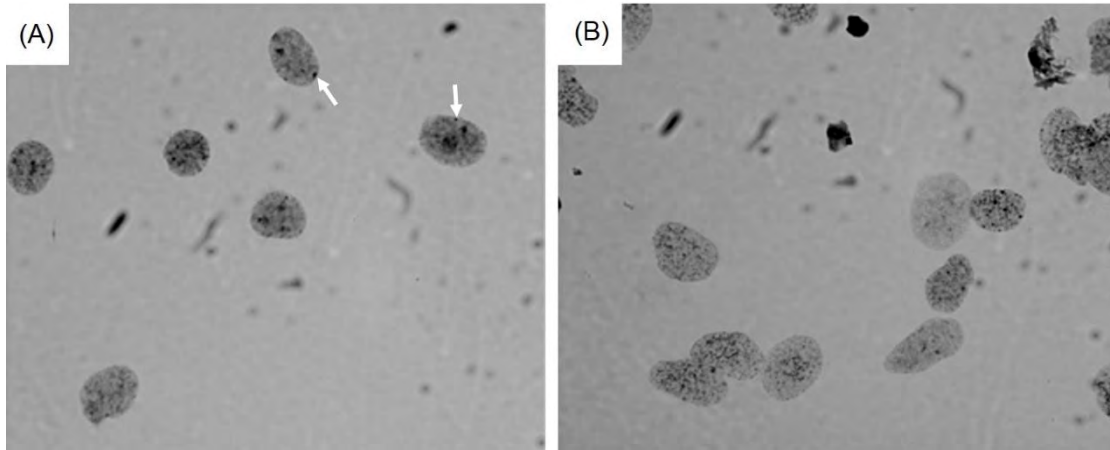


Figura 7. (A-B) Determinación del sexo cromosómico en embriones de *Sturnira lilium* por la presencia o ausencia del corpúsculo de Barr. (A) Núcleos de células amnióticas correspondientes al sexo cromosómico XX, donde se observa la presencia del corpúsculo de Barr en la periferia (flechas). (B) Núcleos amnióticos con ausencia del corpúsculo de Barr que corresponde a una constitución cromosómica XY.

7.3 Migración de las Células Germinales Primordiales (CGPs)

Se lograron identificar tres etapas correspondientes al establecimiento de la gónada indiferenciada. La primera corresponde a una etapa muy temprana (Estadio 11) donde la gónada aún no se constituye pero se pudieron detectar a las CGPs en fase de migración. Las CGPs en este estadio fueron identificadas con ayuda de la expresión de la proteína del gen ***Ddx4***, localizándolas principalmente dentro del epitelio del intestino posterior y en el mesodermo esplácnico que lo rodea (Figura 8). La expresión de la proteína **DDX4** se localizó en el citoplasma de las CGPs, evidenciando que en este estadio las CGPs se encuentran migrando activamente lateral y dorsalmente hacia fuera del epitelio del intestino posterior, mientras que algunas CGPs aún se encuentran inmersas en el epitelio del intestino primitivo (Figura 8D).

7.4 Formación de la gónada indiferenciada

A partir del estadio 13 caracterizado por la presencia de 30 pares de somitas y en donde se detecta por primera vez la aparición de los esbozos de las extremidades,

aquí se establece la gónada indiferenciada, la cual se hace evidente debido a la condensación de células somáticas que envuelven a las CGPs y que están siendo rodeadas por un epitelio celómico en crecimiento (Figura 9). En esta etapa, las CGPs continúan migrando a través del mesenterio intestinal hacia la región gonadal (Figuras 9A y B), donde parecen acumularse en el epitelio celómico de la gónada en desarrollo (Figura 9C y D). La gónada parece indiferenciada, es decir se observa morfológicamente idéntica en los embriones XY y XX.

7.5 Inicio de la diferenciación morfológica de la gónada

El inicio de la diferenciación morfológica de la gónada de *Sturnira liliium* se observó a partir de estadio 17 del desarrollo embrionario (Figura 10). En este estadio las extremidades han dejado de ser un esbozo y se puede observar la formación de los dígitos a través de la membrana interdigital. En embriones XX, no se observaron cambios morfológicos significativos, solo cierto crecimiento en la gónada. Sin embargo, en embriones XY, fue evidente que los cordones sexuales, característicos del establecimiento de una gónada indiferenciada en otros mamíferos y que se encuentran en continuidad con el epitelio celómico en el estadio de gónada indiferenciada, ahora empiezan a ser separados del epitelio celómico como consecuencia de la aparente invasión de mesénquima y vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica (Figura 10), por lo que ahora se les denomina cordones testiculares. La formación de los cordones testiculares, y la diferenciación de las células de Sertoli dentro de estos, se evidenció por inmunodetección de las proteínas de los genes **Sox9** y **Mis**, las cuales se expresan en el núcleo y citoplasma respectivamente de las células de Sertoli. Durante estos cambios morfogenéticos, las CGPs empiezan a quedar localizadas dentro de los cordones testiculares, interactuando con las células somáticas (Figuras 10C y D).

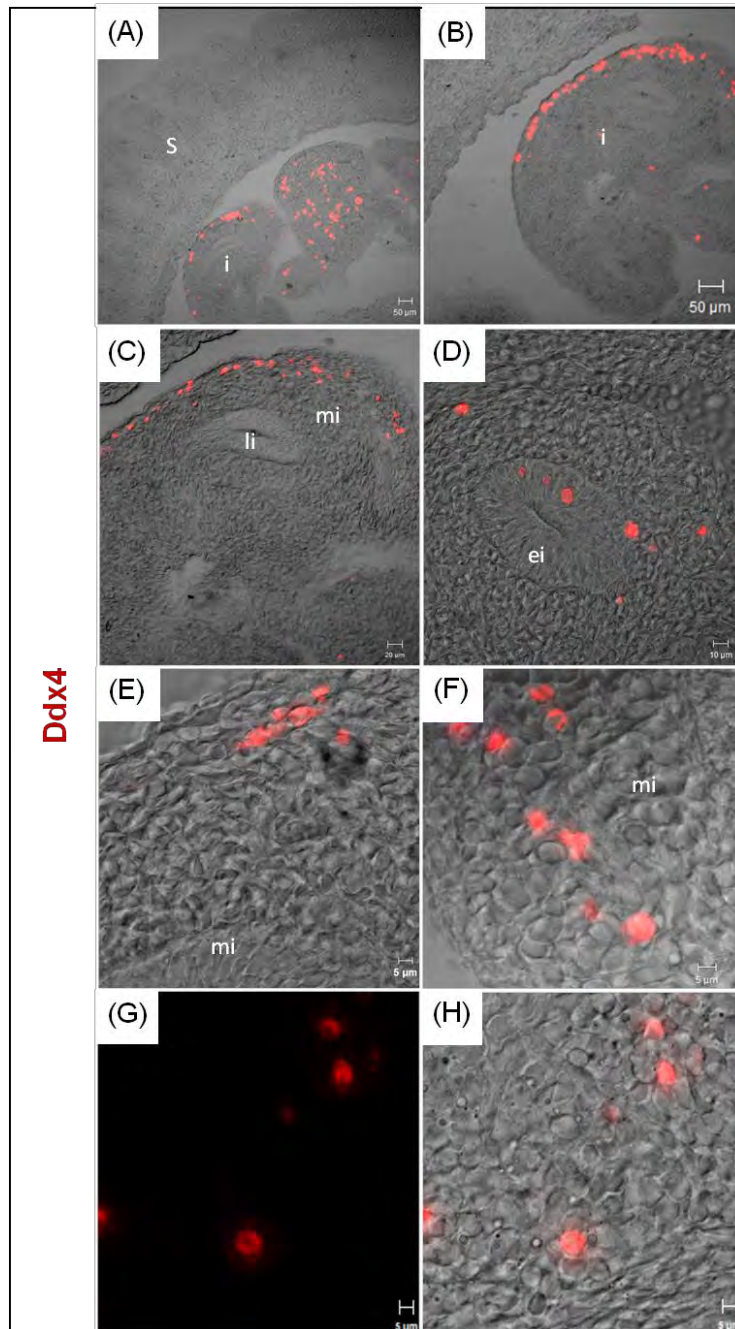


Figura 8. Microscopía confocal y Nomarski en un embrión en el St11 de *Sturnira lilium*. Detección de las CGPs por la expresión de la proteína del gen ***Ddx4***. (A) Sección longitudinal del embrión donde se pueden observar los somitas (s) y el intestino en formación (i). (B) CGPs positivas a ***Ddx4*** localizadas en el endodermo intestinal (ei). (C) Amplificación de la región intestinal donde se visualiza la luz intestinal (li) con CGPs ubicadas en el endodermo intestinal. (D-H) Amplificación de CGPs donde el patrón de expresión de ***Ddx4*** se localiza en el citoplasma de las CGPs (rojo) las cuales se encuentran en el mesenterio intestinal (mi).

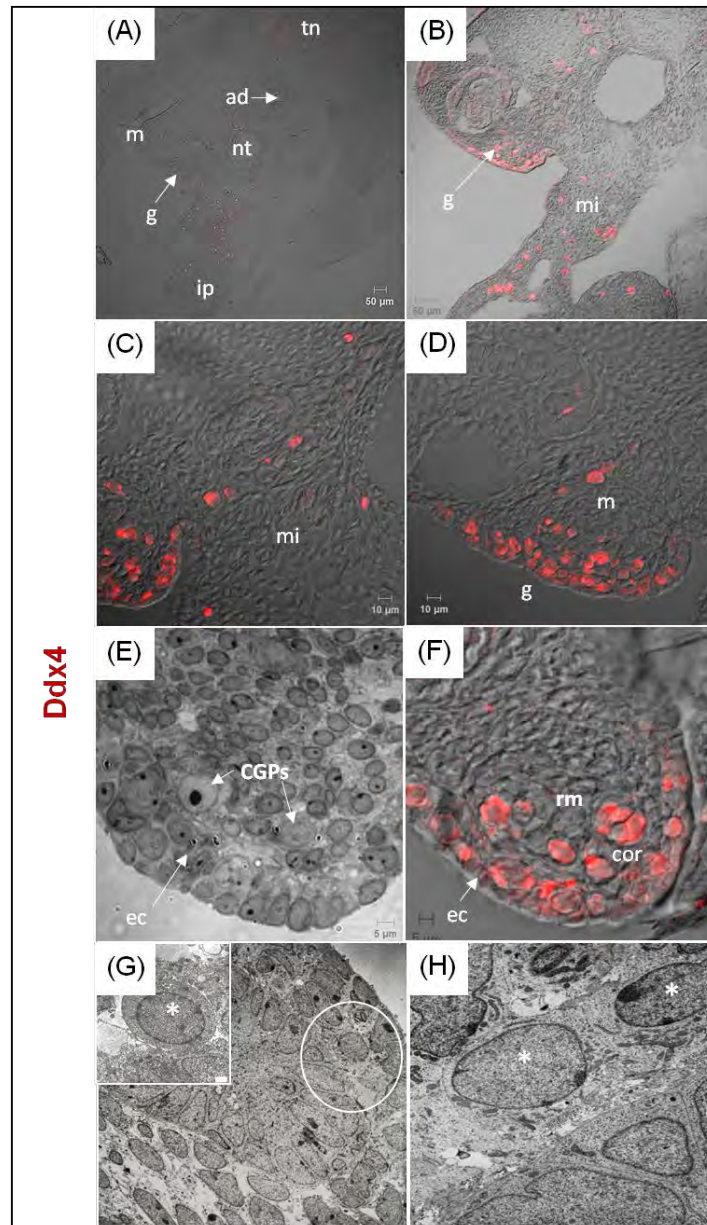


Figura 9. Establecimiento de la gónada indiferenciada en embriones del St13 de *Sturnira lilium*. (A) Sección transversal de la región caudal de un embrión. Tubo neural (tn), aorta dorsal (ad), notocorda (nt), gónada (g) adyacente a la región mesonefrónica (m) e intestino posterior (ip). La migración de CGPs se puede observar en rojo. (B) Amplificación de la región del mesenterio intestinal (mi) donde se pueden observar las CGPs tanto en migración (roja) como colonizando la región gonadal (g). (C) Parte de la región gonadal (g) y el mesenterio intestinal (mi) donde se observa la migración y la colonización de las gónadas por las CGPs. (D) Región gonadal (g) colonizada por CGPs (rojo) y unida a la región mesonefrica (m). (E) Sección transversal a nivel de microscopía de campo claro de la región gonadal, donde se pueden observar CGPs en la región medular que está rodeada por epitelio celómico (ec). (F) La proteína para el gen ***Ddx4*** se localiza en el citoplasma de las CGPs (rojo) y se puede ver tanto en la región medular (rm) como en la corteza (cor) de la gónada indiferenciada. (G-H) Microscopía electrónica de transmisión de la región intestinal donde las CGPs se pueden observar en fase de migración, evidenciada por la presencia de un núcleo redondo y prominente (*) y la extensión de su citoplasma.

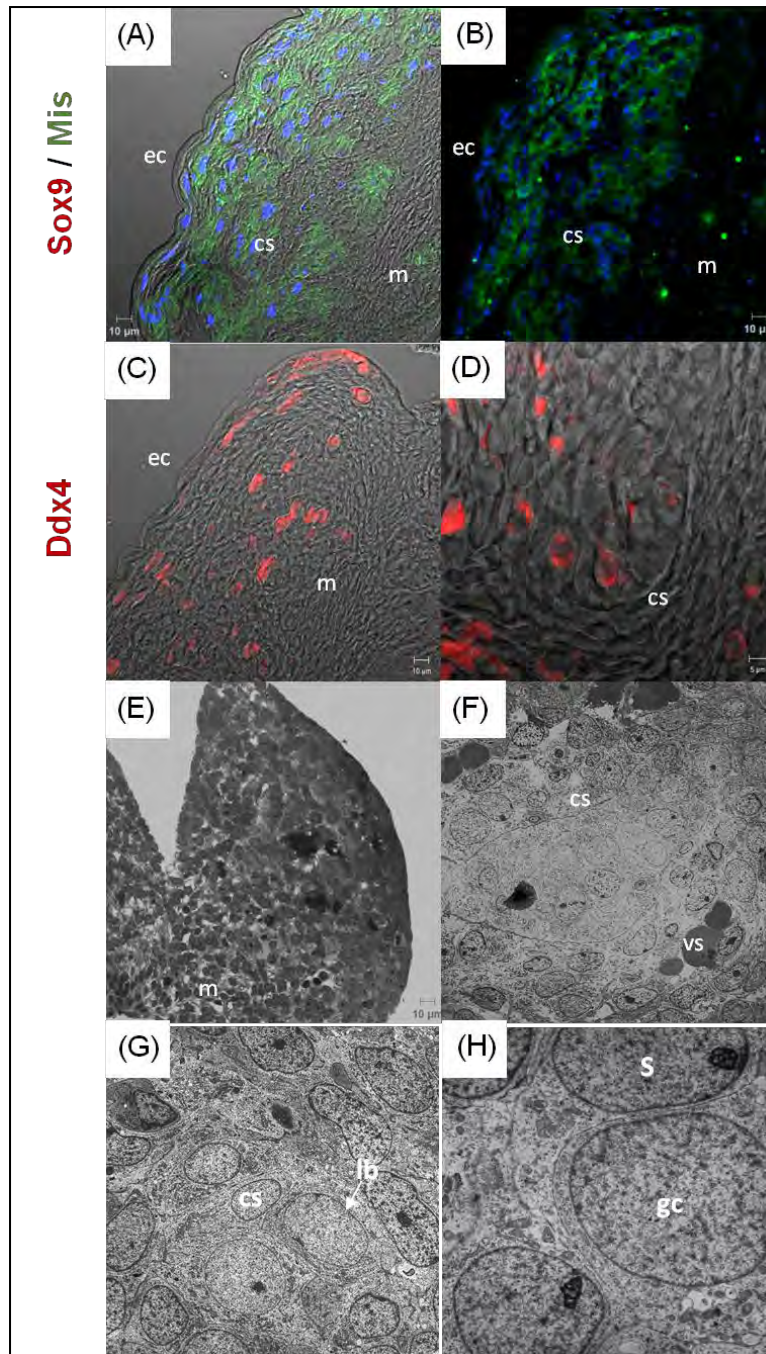


Figura 10. Inicio de la diferenciación morfológica de la gónada en embriones de *Sturnira liliun* en el St17. (A) Detección de la proteína de los genes **Sox9** (azul) y **Mis** (verde) combinándolos sin luz y con luz (Nomarski). (B), donde es evidente el inicio de la separación de los cordones seminíferos (cs) del epitelio celómico (ec). (C) Expresión de **Ddx4** que permite ubicar a la línea germinal (rojo) en la gónada. (D) se muestra con mayor detalle (C), que **Ddx4** se localiza en el citoplasma de las células germinales (rojo), que se incorporan a los cordones seminíferos. (E) A nivel de microscopía de luz, se corroboró la diferenciación de la gónada masculina en el St17. (F-H) A nivel de microscopía electrónica, se observaron cordones seminíferos (cs) formados por células germinales (gc) y células de Sertoli (S) y delimitados por una lámina basal (lb). Los vasos sanguíneos se localizaron fuera de los cordones testiculares.

7.6 Diferenciación testicular

En el estadio 18 ya no se observa tejido entre el primero y el segundo dígito, dejando libre al pulgar del resto de la placa de la mano; mientras que el quiropatagio se observa más delgado entre el resto de los dígitos (Figura 4). Aquí, en los embriones XY los cordones testiculares continúan siendo trasladados hacia la región medular de la gónada, por lo que para el estadio 19, estos ya han sido separados completamente del epitelio celómico (Figura 11). Los cordones que se encuentran más hacia la región medular se encuentran enlongados, mientras que hacia la región cortical ya se han fragmentado y se observan más circulares (Figuras 11E y F). La incorporación de las CGPs dentro de los cordones testiculares se hizo evidente por su expresión a la proteína Ddx4 (Figuras 11C y D). Analizando las CGPs a mayor resolución, observamos que estas se encuentran dentro de los cordones testiculares presentando una morfología característica de una célula en reposo mitótico, es decir, presentan un núcleo donde la cromatina se encuentra homogéneamente distribuida. Esta distribución difusa de la cromatina en el núcleo de las CGPs sugiere que la proliferación de este linaje ha cesado y ahora se les puede denominar espermatogonias (Figuras 11G y H). La localización de las espermatogonias dentro de los cordones testiculares se confirmó por la inmunodetección de este linaje empleado la proteína del gen **Ddx4** (figuras 11C y D). La fragmentación de los cordones testiculares también se evidenció por la expresión de las proteínas de los genes **Sox9** y **Mis** los cuales caracterizan a las células de Sertoli y se localizaron principalmente en la periferia de los cordones testiculares (Figuras 11A y B).

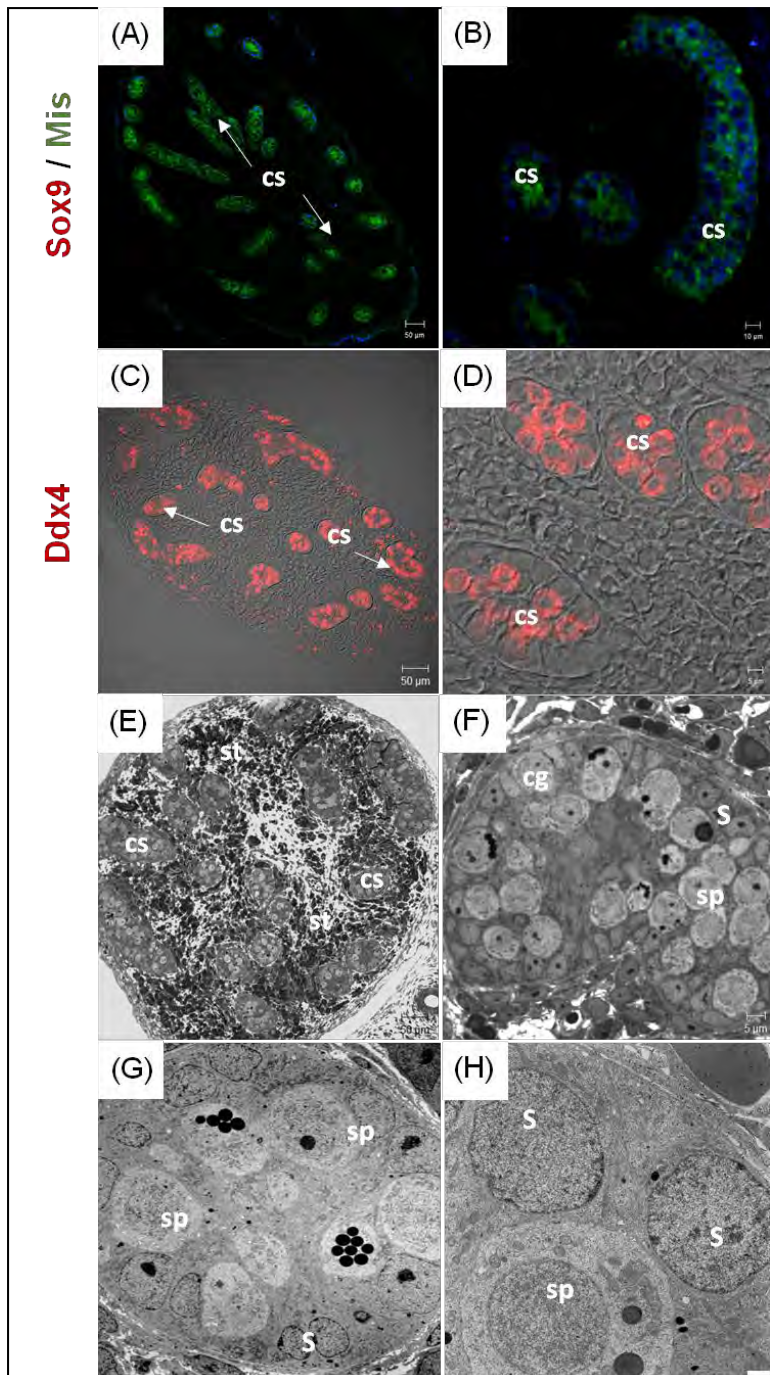


Figura 11. Diferenciación morfológica del testículo en embriones de *Sturnira liliium*. (A-B) Detección de la proteína del gen **Sox9** (azul) en el núcleo y **Mis** (verde) en el citoplasma de las células de Sertoli en el testículo de *S. liliium* en el St19. (C-D) Expresión de la proteína **DDX4** en el citoplasma de las espermatogonias (rojas) localizadas dentro de los cordones seminíferos (cs). (E) Microscopía de campo claro del testículo de *S. liliium* en el St19 donde se observan cordones seminíferos (cs) rodeados por tejido estromal (te). (F) A mayor detalle se puede observar que los cordones seminíferos están formados por las células de Sertoli (S) y espermatogonias (sp), morfología corroborada con microscopía electrónica de transmisión (G). (H) El núcleo de las espermatogonias (sp) presenta cromatina distribuida homogéneamente.

7.7 Diferenciación ovárica

A partir del estadio 18 del desarrollo embrionario de *Sturnira lilium*, ya es posible distinguir morfológicamente un ovario de un testículo. Al analizar el desarrollo ovárico en el estadio 19, donde el pulgar y todos los dígitos de las extremidades posteriores se observan con primordios de garras en la punta (Figura 12) a nivel de microscopía de campo claro, el ovario parece no mostrar cambios con respecto a la estructura del gónada indiferenciada; solo se puede observar cierto crecimiento, debido probablemente a la proliferación tanto de células somáticas como de CGPs (Figuras 12A y C). Sin embargo, a mayor resolución empleando microscopía electrónica, observamos que las células germinales primordiales presentan un núcleo donde la cromatina se observa condensada formando estructuras similares a los cromosomas (Figura 12E). Aumentando aún más la resolución, se evidenció que las CGPs con condensación de la cromatina exhiben la formación de complejos sinaptonémicos, lo que sugiere que estas células han iniciado la meiosis (Figuras 12F y G). Estas células germinales, ahora denominadas ovocitos, se encuentran agrupadas dentro de cordones y en algunos casos ya se encuentran interactuando con células somáticas (Figura 12G y H).

7.8 Proliferación celular en ovarios adultos del murciélago *Artibeus jamaicensis*

Para demostrar *in situ* la proliferación de las células germinales corticales adultas (CGCA) en el ovario del murciélago *Artibeus jamaicensis*, se analizó la expresión de marcadores de proliferación celular. Debido a que la proliferación celular en las CGCA es de suma importancia para relacionar a estas células con un linaje progenitor, es esencial identificar división celular en ellas, por ello se analizaron diferentes marcadores de proliferación entre los que se encuentra **Fosfo-Histona 3 (pH3)**, **Ki-67**, **PCNA** y **BrdU** ya que los puntos de expresión dentro del ciclo celular se dan en diferentes etapas (Figura 13), lo que nos permitirá identificar y validar la proliferación en las CGCA.

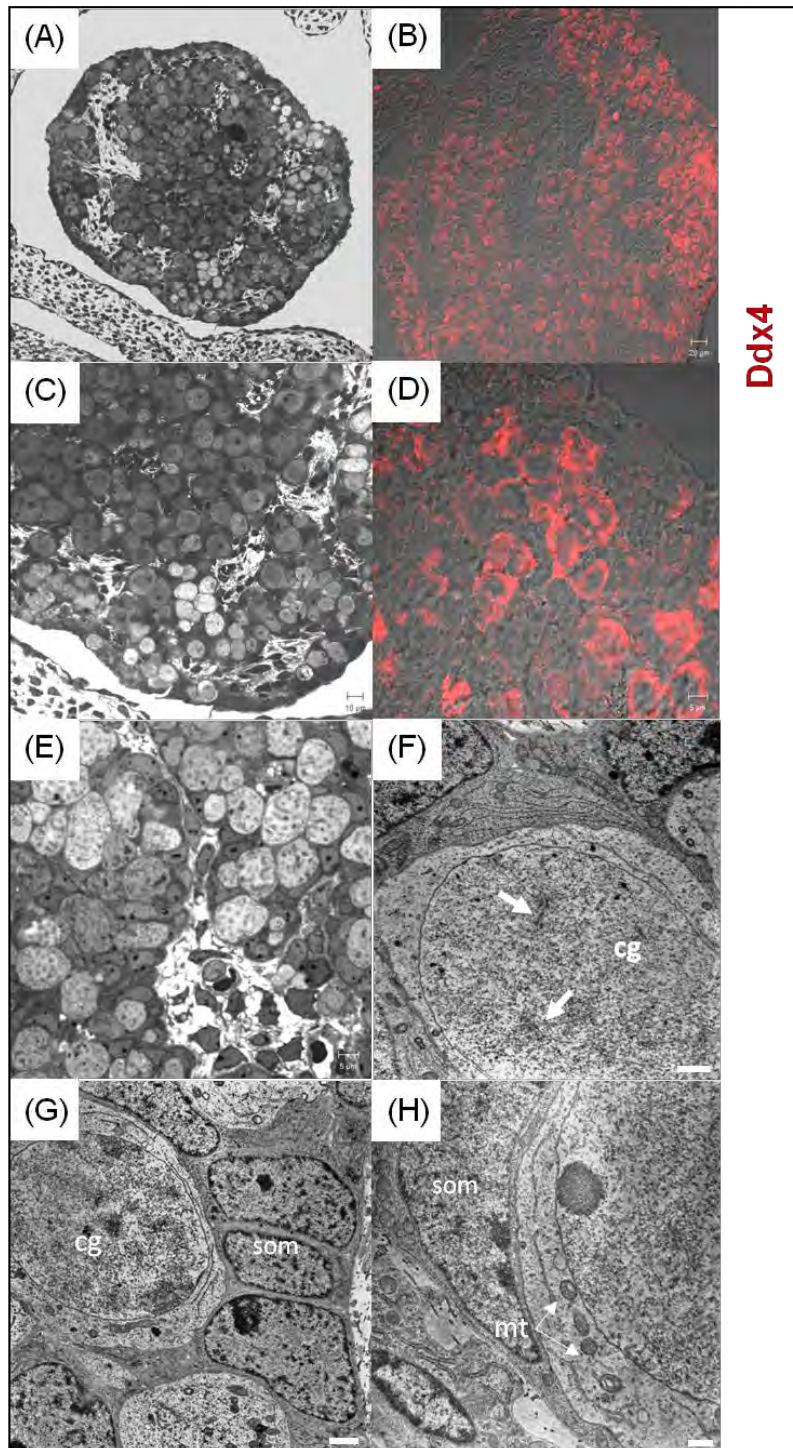


Figura 12. Diferenciación morfológica del ovario en embriones de *Sturnira lilium*. Microscopía de campo claro (A y C), detección de la expresión de la proteína del gen **Ddx4** (B - E) en el ovario en el St19, donde se puede observar un gran número de células germinales (cg). (F y G) A nivel de microscopía electrónica, se observó que las células germinales (gc) habían iniciado la meiosis debido a la presencia de complejos sinaptonémicos (flechas en F). (H) Interacción de ovocitos con células somáticas (som), que indica el inicio de la foliculogénesis. La presencia de mitocondrias (mt) de las crestas tubulares en el citoplasma del ovocito es evidente.

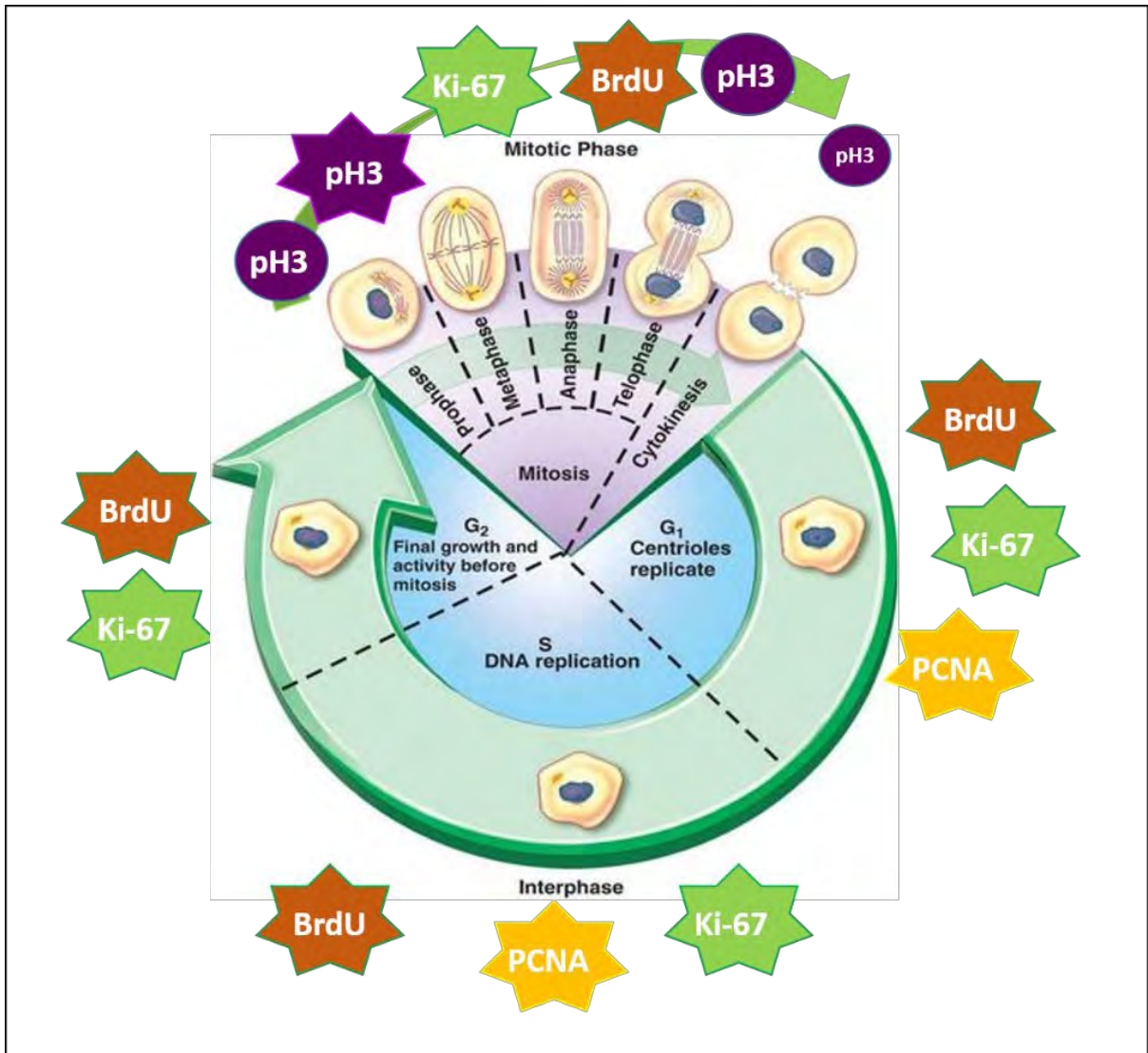


Figura 13. Esquema de los puntos de expresión dentro del ciclo celular de **Ki-67**, **PCNA**, **pH3** y **BrdU**. **Ki-67** se detecta en el núcleo durante la interfase del ciclo celular, está presente en las fases G1, S, G2 Y M y ausente en G0. **PCNA** es sintetizado en la fase G1 temprana y la fase S del ciclo celular. **pH3** la fosforilación de la Histona 3 (H3) en Ser10, Ser28 y Thr11 está estrechamente relacionada con la condensación de la cromatina durante la mitosis. La incorporación de **BrdU** se lleva a cabo en la fase S.

Observamos que en el ovario adulto del murciélago *Artibeus jamaicensis* hay células afines a **pH3**, **Ki-67** y **PCNA**, detectándose principalmente marca positiva en las células de la granulosa (Figura 14). También pudimos observar que algunas células localizadas en la región cortical del ovario son positivas a estos marcadores, lo que indicaría proliferación en estas células.

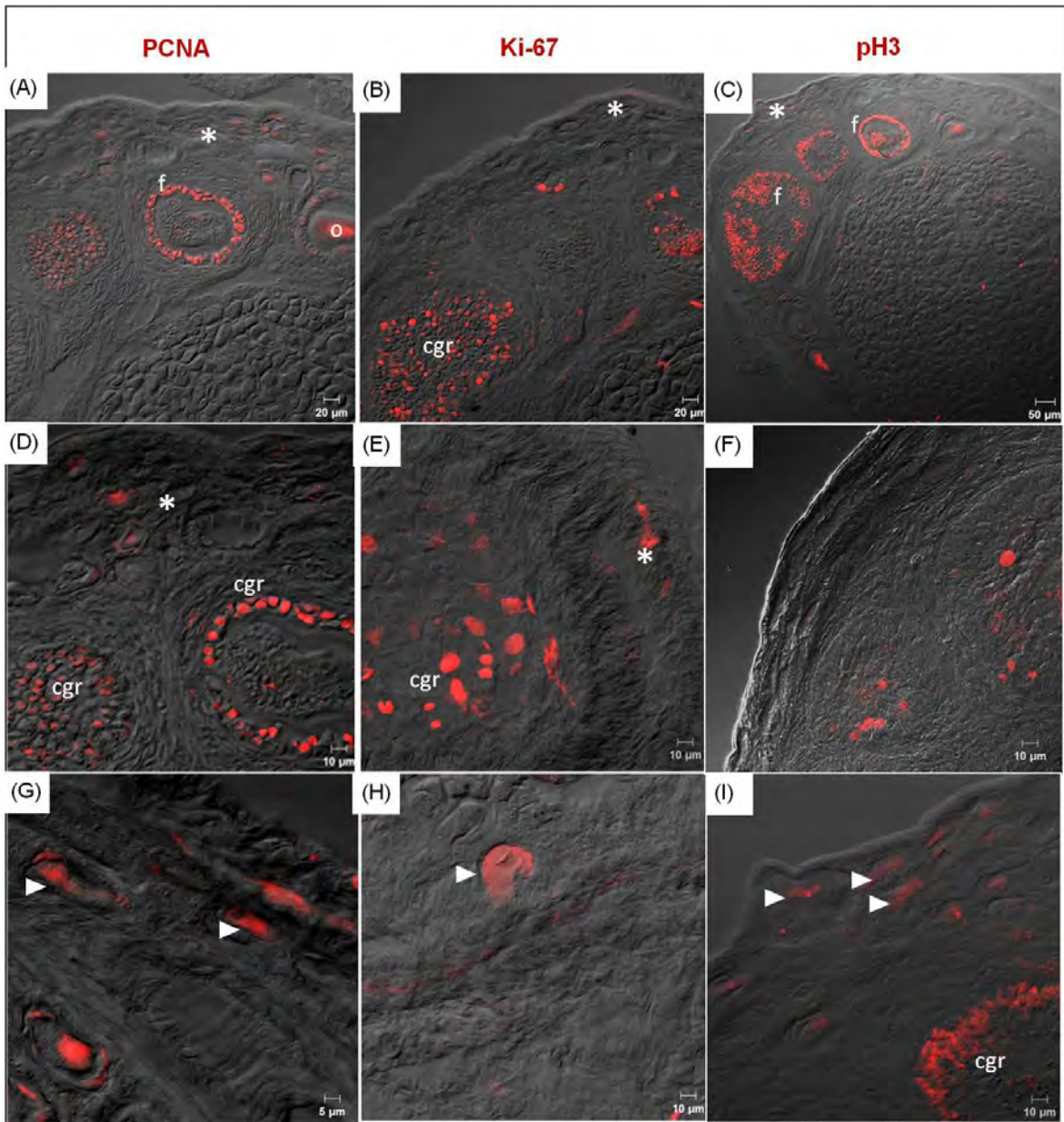


Figura 14. Inmunodetección de **PCNA**, **Ki-67** y **pH3** en ovarios adultos del murciélago *Artibeus jamaicensis*. (A, D, G) Se muestra al expresión de **PCNA** en células de la granulosa, células corticales (cabeza de flecha) y ovocitos (o). (B, E, H) Se muestra la expresión de **Ki-67** en algunas células de la granulosa (cgr) y en CGCA localizadas en la región cortical (cabeza de flecha), las cuales no se observan rodeadas de células somáticas. (C, F, I) Se muestra la expresión de **pH3** en el ovario, en células de la granulosa (cgr) que forman folículos y se pudieron identificar CGCA (cabeza de flecha) positivas a **pH3**.

7.9 Marcaje con BrdU

A la par se utilizó la incorporación de 5-bromo-2'-deoxy-uridina (**BrdU**) ya que es ampliamente utilizada para determinar el número de células que se hallan en fase de síntesis. Debido a que la **BrdU** es un nucleótido sintético análogo a la timidina, esta semejanza permite una sustitución casi total de los nucleótidos de timidina en las células en fase de síntesis esto permite que las moléculas de **BrdU** se incorporen al ADN durante el proceso de replicación.

Debido a que no existen reportes sobre la incorporación de BrdU en murciélagos y como un control positivo al experimento se utilizó el intestino como control, ya que este órgano está constituido por un epitelio cuyo ciclo celular es de corta duración lo que le permite una regeneración continua para compensar el desgaste epitelial al que está sometido.

Debido a que el material biológico de murciélago es escaso y por tanto muy valioso, la técnica de proliferación celular *in situ* se estandarizó en ovarios de ratón. En la Figura 15 muestra la expresión de **BrdU** en las células epiteliales del intestino delgado y en células de la granulosa en el ovario, lo que evidencia una correcta administración de la **BrdU** y un buen desarrollo del protocolo. En las hembras adultas del murciélago *Artibeus jamaicensis* se logró la incorporación de **BrdU** en las células. De la misma manera que en el ratón se utilizó al intestino como tejido control por su alta tasa de proliferación celular, donde se identificó la expresión de **BrdU** en células del epitelio intestinal. En el caso del ovario se identificó la incorporación de la **BrdU** en algunas células de la granulosa y un hallazgo importante para este estudio fue la visualización de la **BrdU** en algunas células germinales localizadas en la región cortical de los ovarios (Figura 16).

Con la finalidad de conocer la especificidad del patrón de expresión encontrado de la **BrdU**, se analizó este con el patrón de expresión de otros marcadores de proliferación (PCNA y Ki-67). Con este doble inmunomarcaje observamos que no

todas las células colocalizan para ambos marcadores, por lo que podríamos sugerir que se encuentran en diferentes fases el ciclo celular (Figuras 17 y 18).

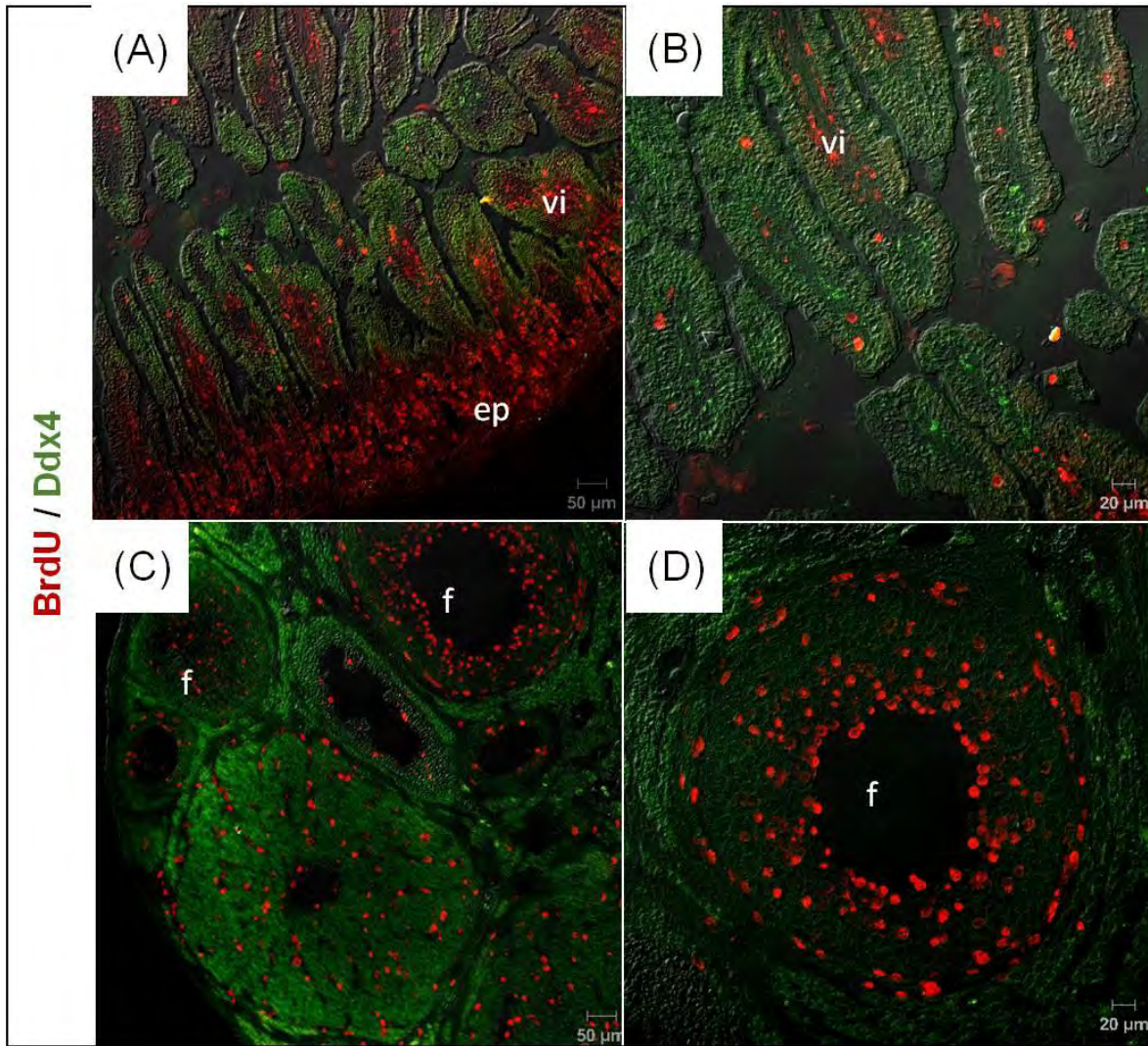


Figura 15. Detección de la expresión de la BrdU en el intestino y el ovario del ratón transgénico B6B5/EGFP que acarrea la proteína verde fluorescente (verde). (A y B) Localización de células positivas a la BrdU (rojo) en el epitelio intestinal (ep) y dentro de las vellosidades intestinales (vi). (C y D) Detección de la expresión de la BrdU (rojo) en las células de la granulosa de folículos (f) en diferentes etapas de la foliculogénesis.

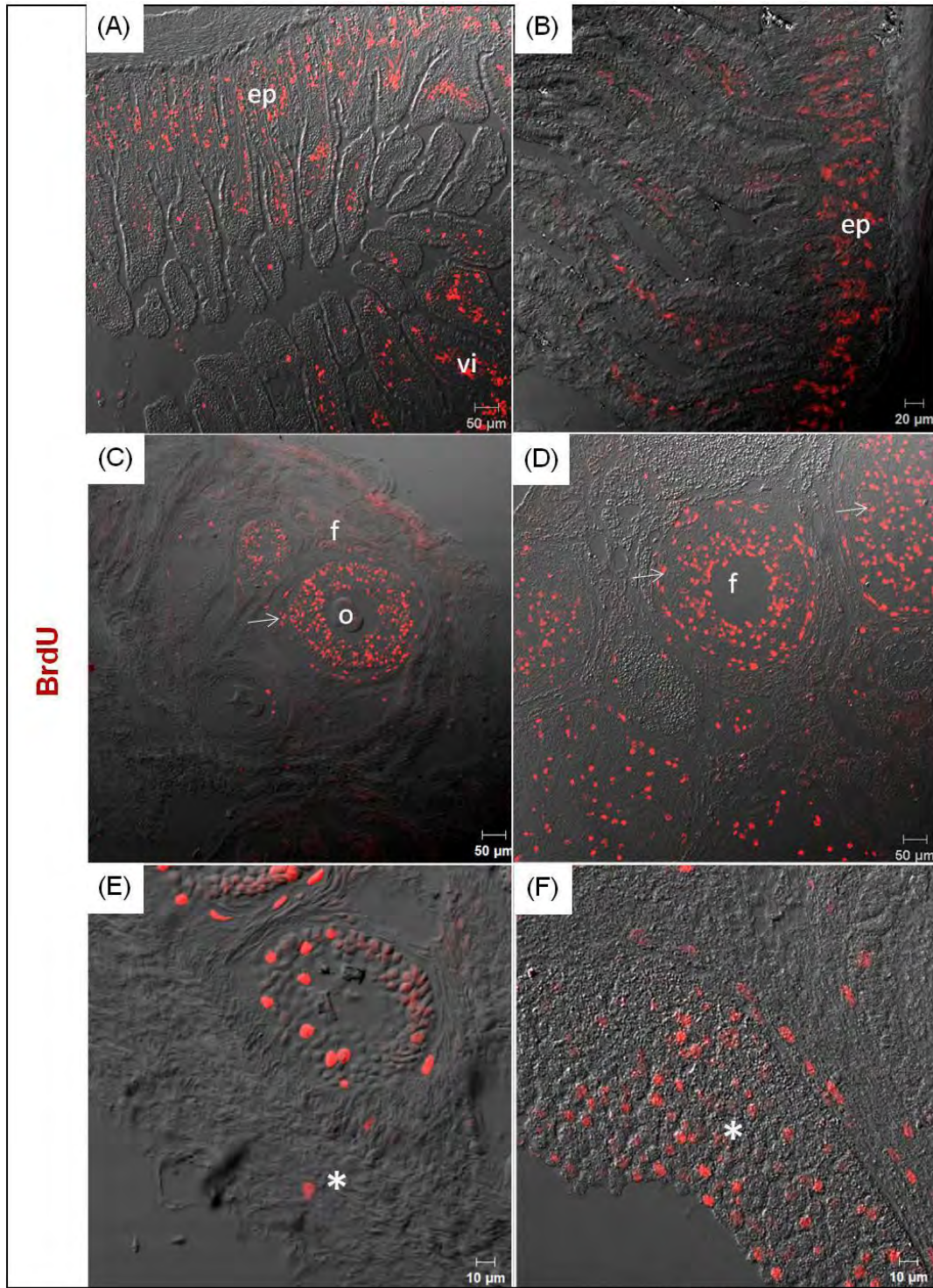


Figura 16. Inmunolocalización de la **BrdU** en el intestino y ovarios adultos del murciélago *Artibeus jamaicensis*. (A y B) Detección de la **BrdU** en células del epitelio intestinal (ep) y dentro de las vellosidades intestinales (vi). (C-D) Detección de la **BrdU** en las células de la granulosa que conforman los folículos (flechas). (E-F) Amplificación de la región cortical del ovario de *A. jamaicensis* donde se observan células positivas a la **BrdU** (*).

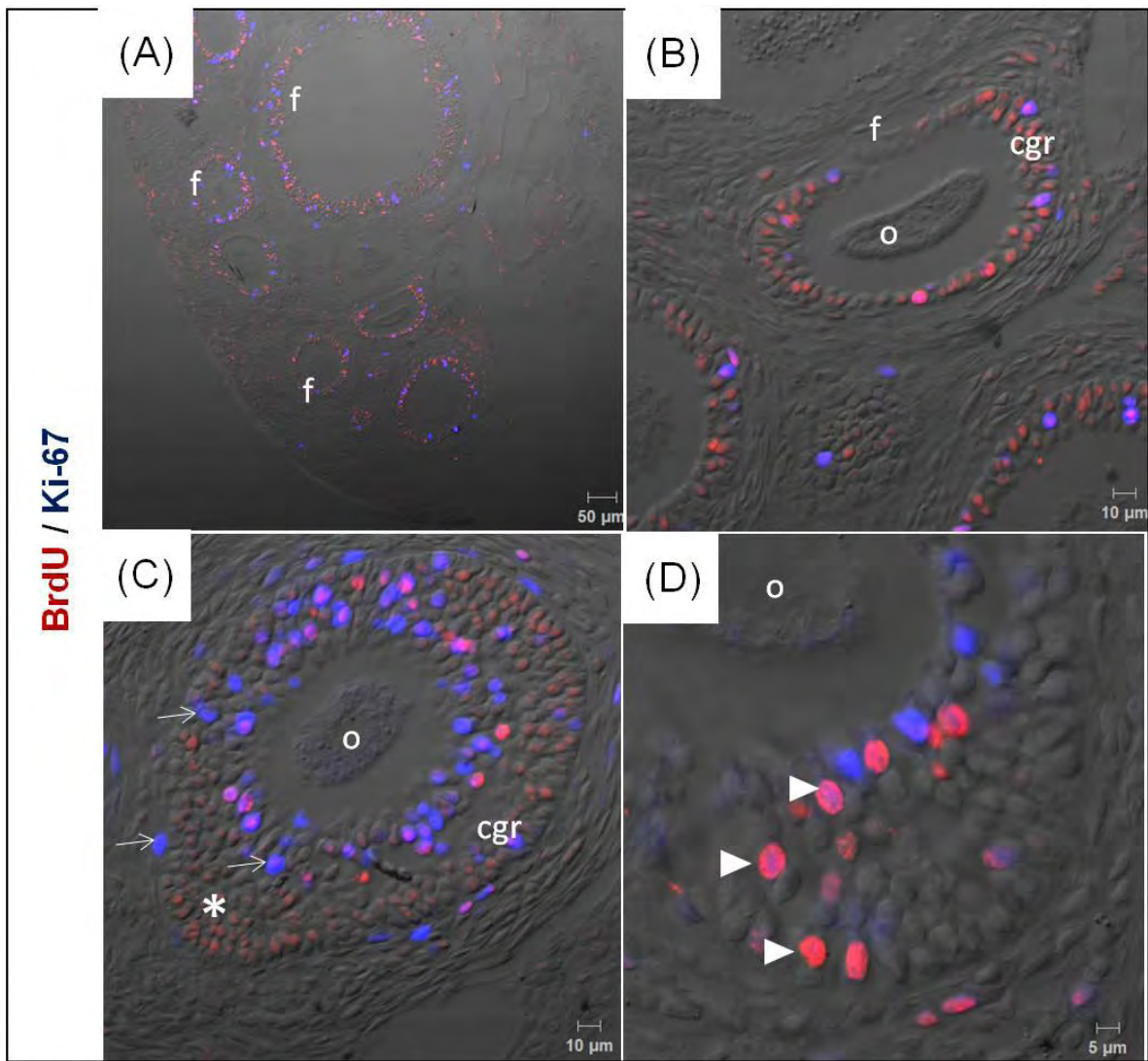


Figura 17. Doble inmunolocalización de la **BrdU** y **Ki-67** en el ovario adulto del murciélago *Artibeus jamaicensis*. (A) Se la expresión de la **BrdU** (rojo) y de **Ki-67** (azul) en algunas células de la granulosa de folículos en diferentes estados de la foliculogénesis. (B) A mayor aumento de observa que solo algunas células de la granulosa son positivas a la **BrdU** y a **Ki-67**, mientras que los ovocitos son negativos. (C) Se presenta un folículo con las células de la granulosa positivas a **Ki-67** (flecha) y a **BrdU** (*). (D) A mayor resolución fue posible detectar la co-localización de **BrdU** y **Ki-67** en algunas células de la granulosa (cabeza de flecha).

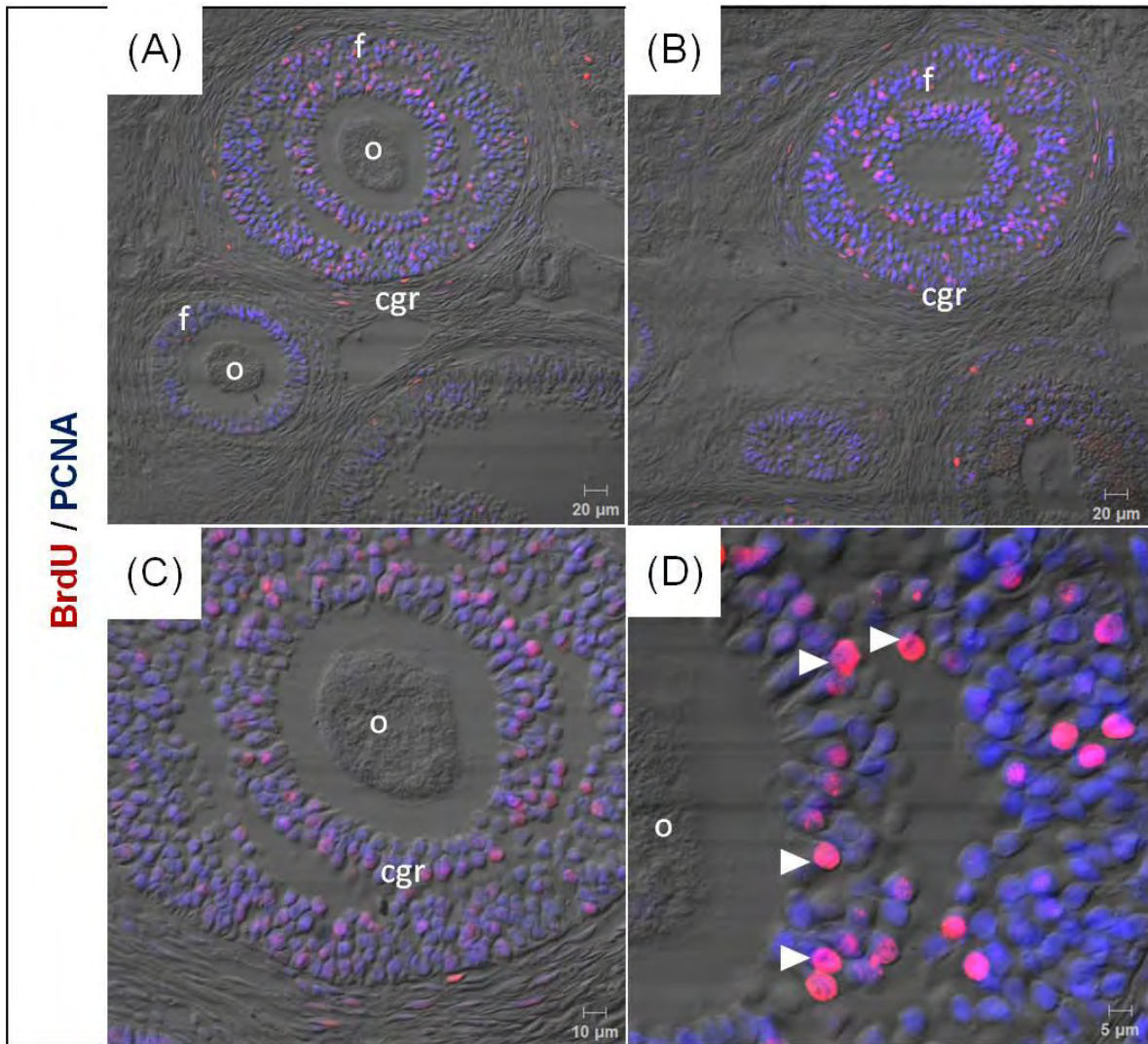


Figura 18. Doble inmunolocalización de la **BrdU** y del **PCNA** en ovarios adultos de murciélago *Artibeus jamaicensis*. (A y B) Tanto la **BrdU** (rojo) como el **PCNA** (azul) se localizaron principalmente en las células de la granulosa (cgr) que conforman los folículos (f) en diferentes etapas de la foliculogénesis. En los ovocitos (o) no se detectó señal de ninguno de los marcadores. (C) En un aumento de (A) se muestra un folículo ovárico constituido por un ovocito (o) y células de la granulosa (cgr) en donde la mayoría de estas células de la granulosa son positivas al **PCNA** y en menor número positivas a la **BrdU**. (D) A mayor resolución se identificó la co-localización de la **BrdU** (rojo) y del **PCNA** (azul) (cabeza de flecha) en algunas células de la granulosa (cgr).

7.10 Doble inmunodetección de Ddx4/BrdU en CGCA

Para determinar que las CGCA están proliferando es esencial buscar la colocalización de la **BrdU** con marcadores específicos de células germinales. Por ello se realizó un doble marcaje para identificar la expresión del gen **Ddx4**, característico de las CGPs, en células positivas a **BrdU**. Se identificó la expresión de **Ddx4** en ovocitos y en CGCA, sin embargo la expresión de la **BrdU** se restringió a algunas células de la granulosa (Figura 19 y 20). Hasta el momento no se logró detectar colocalización de estos marcadores en las CGCA del ovario adulto de murciélago.

A la par a esta se trabajó con una laminilla que estuvo sujeta al mismo tratamiento excepto que solo estuvo expuesta a los anticuerpos secundarios (control negativo) y donde no se identifica la expresión de **Ddx4** ni **BrdU** lo que sugiere que la marca observada es específica para **Ddx4** (células germinales) y **BrdU** (proliferación).

7.11 Disgregación celular de ovario adulto

Para realizar nuestros experimentos de disgregación-reagregación celular, empleamos como modelo control al ratón B6B5/EGFP, el cual acarrea la proteína verde fluorescente (PVF), que es un gen reportero ampliamente utilizado (Figura 21). La expresión de la PVF permite distinguir tejido ajeno al ratón, lo que nos permitió distinguir los componentes celulares ováricos del murciélago de los del ratón cuando se realizaron disgregados ya que estos son negativos a PVF (Figura 22) y de esta forma analizar el comportamiento de las CGCA.

Para cumplir el objetivo de investigación que plantea aislar a las Células Germinales Corticales Adultas (CGCA) fue necesario estandarizar la metodología de disgregación celular. En los disgregados ováricos de ratón, se observaron células aisladas y distribuidas de manera aleatoria con diferente tinción, las células somáticas del ovario se observan más oscuras en comparación con las células

germinales, también se puede apreciar la diferencia de tamaño siendo las células germinales más grandes que las somáticas, y por morfología en este disgregado celular cabe resaltar que no se observan estructuras parecidas a folículos (Figura 23).

Inicialmente se pretendió realizar la disgregación completa del ovario adulto de murciélago bajo estas condiciones, el resultado no fue el mismo, al obtenido del ovario de ratón, esto puede deberse a que el ovario de murciélago es muy fibroso y duro lo que hace difícil penetrar a las enzimas. Por ello se optó por realizar una microdissección del ovario ya que en él se distingue *in situ* fácilmente la región cortical de la región medular. De esta manera se trabajó con una menor cantidad de tejido teniendo una mejor manipulación. Mediante el uso de una aguja de insulina utilizada como un micro-bisturí se logra separar ambas regiones del ovario (Figura 24). La región cortical es disgregada enzimáticamente y con microscopia de campo claro observa un mayor número de ovocitos sin células de la granulosa rodeándolos y no se perciben células dañadas por las enzimas o el manejo mecánico (Figura 25).

7.12 Aislamiento de las Células Germinales Corticales Adultas

Para aislar las CGCA se utilizó el marcador de superficie celular anti-Fosfatasa Alcalina (FA). La inmunodetección de la fosfatasa alcalina arrojó que su expresión se restringe a células de la región cortical, observando la marca en la superficie de las células que por tamaño y posición podrían corresponder a CGCA (Figura 26). Además otra razón para utilizar FA es porque su expresión se detecta en las CGP desde su especificación en la base del alantoides alrededor de 7.5 *dpc* en el ratón, durante la ruta migratoria hasta el arribo a las cresta genital y comienza a reducirse hasta apagarse una vez que las CGPs entran en meiosis alrededor de los 13.5 *dpc*. Además la FA es un marcador de superficie celular lo que permite una interacción más firme entre los anticuerpos que lleva a una separación más específica del linaje de interés.

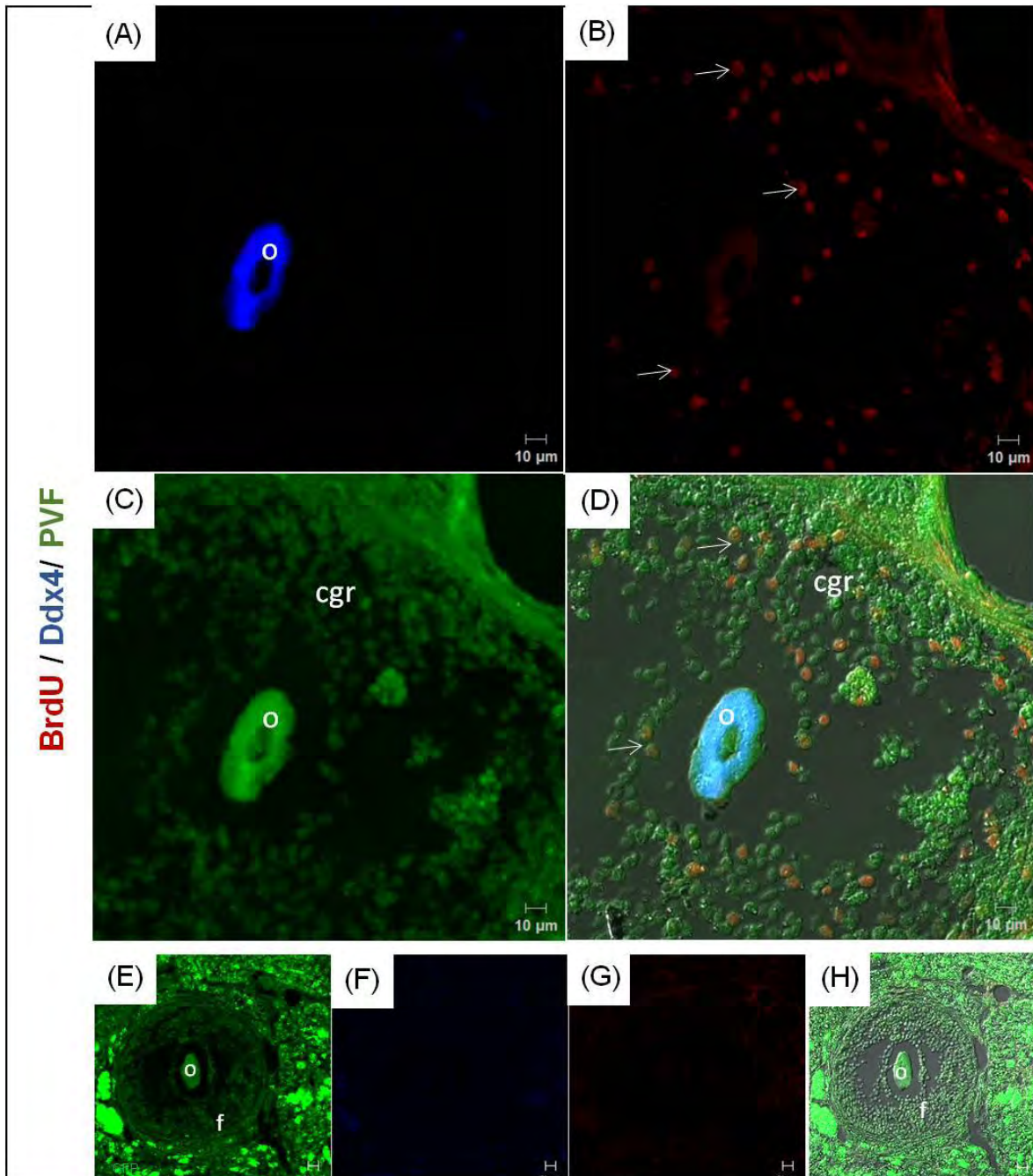


Figura 19. Doble inmunomarcaje para la co-localización de la proteína **Ddx4** y de la **BrdU** en el ovario adulto del ratón B6B5/EGFP. (A) Se observa un ovocito (o) positivo a **Ddx4** (azul). (B) Detección de la **BrdU** en las células de la granulosa (flechas). (C) Se muestra la expresión endógena de la proteína verde fluorescente el ovario de ratón donde los ovocitos (o) y las células de la granulosa (cgr) son verdes. (D) Localización del patrón de expresión de la **BrdU** (rojo) en algunas células de la granulosa (cgr) las cuales rodean a un ovocito (o) positivo a **Ddx4** (azul). (E-H) Se muestra el control negativo del experimento donde no se observa la expresión de **Ddx4** ni de la **BrdU**.

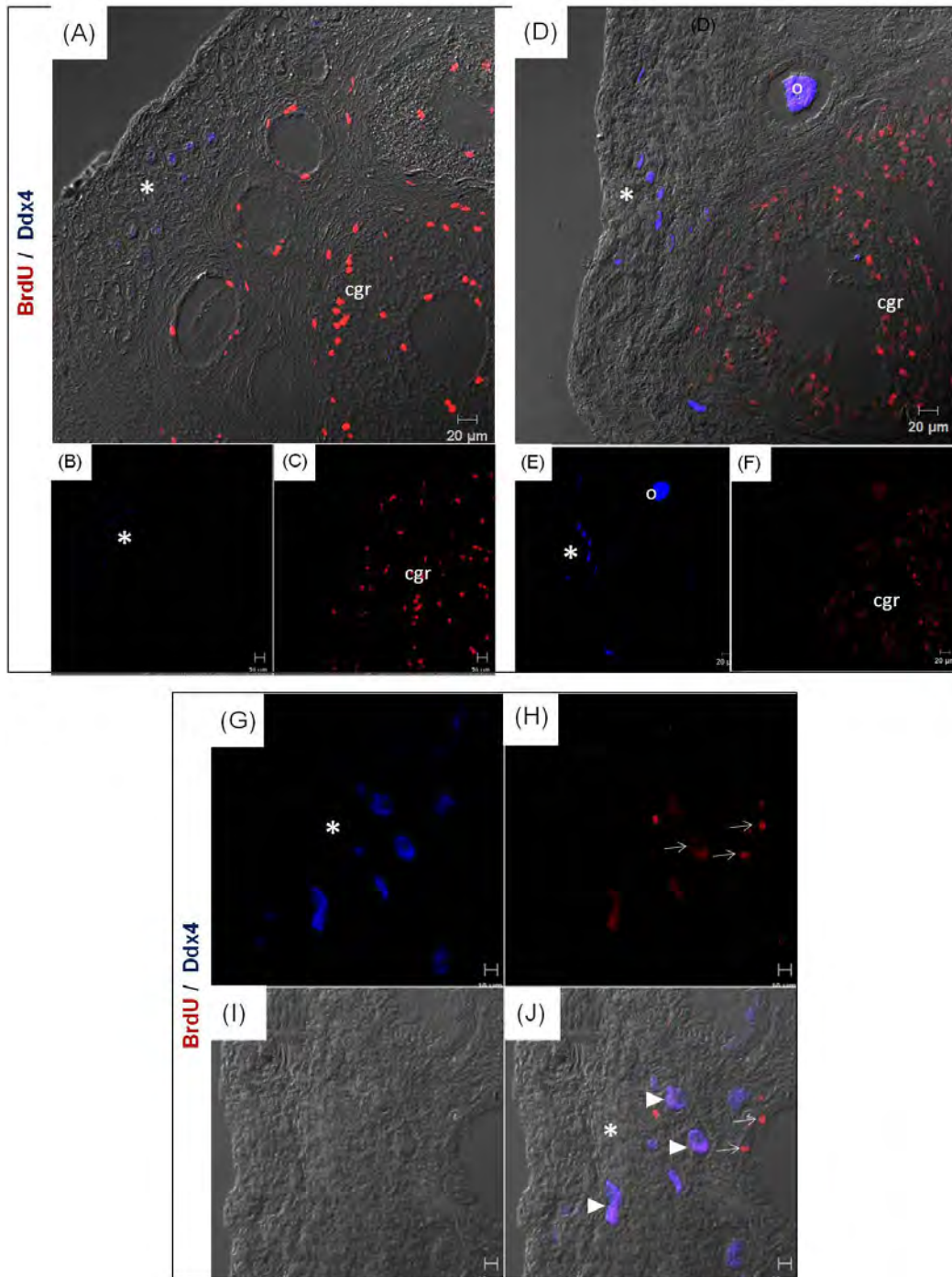


Figura 20. Doble inmunodetección para la detección de la proteína **Ddx4** (azul) y BrdU (rojo) en el ovario adulto del murciélago *Artibeus jamaicensis*. (A-C) se observa la expresión de BrdU en células de la granulosa (cgr) y el células localizadas en la región cortical (*). (D-F) Se observa la expresión de **Ddx4** en un ovocito (o) y en algunas células presentes en la región cortical (*) también se observan algunas células de la granulosa (cgr) positivas a **BrdU**. (G-J) Mayor aumento de la región cortical del ovario donde se observan CGCA positivas a **Ddx4** y (J) la co-localización de algunas células con la **BrdU** (cabeza de flecha).

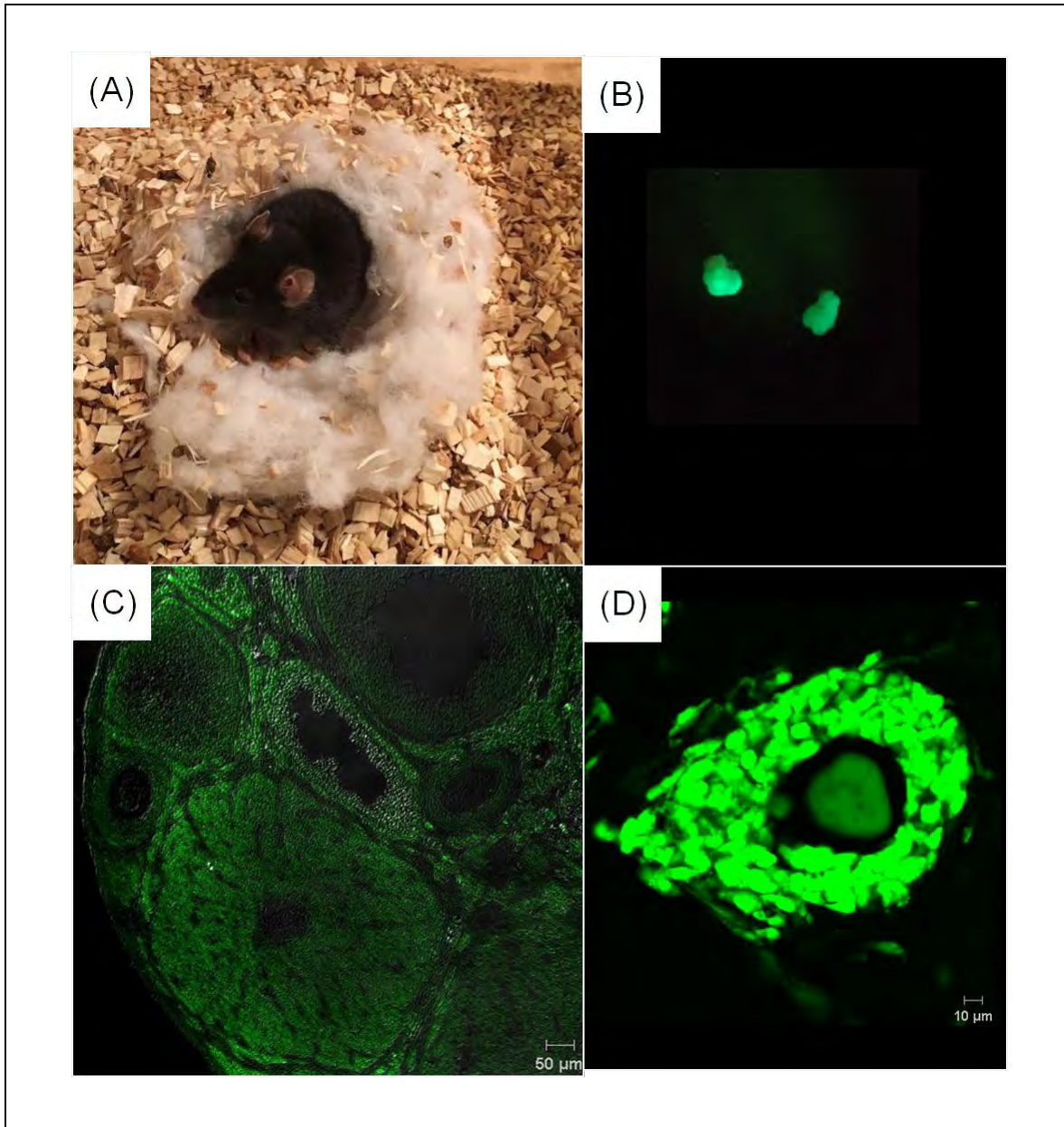


Figura 21. (A) Ratón de la cepa B6B5/EGFP. Es un ratón transgénico el cual acarrea la proteína verde fluorescente (PVF), (B) se muestra los ovarios *in situ*, (C) un corte histológico del ovario donde se observa la expresión de PVF y en (D) a mayor detalle un folículo ovárico.

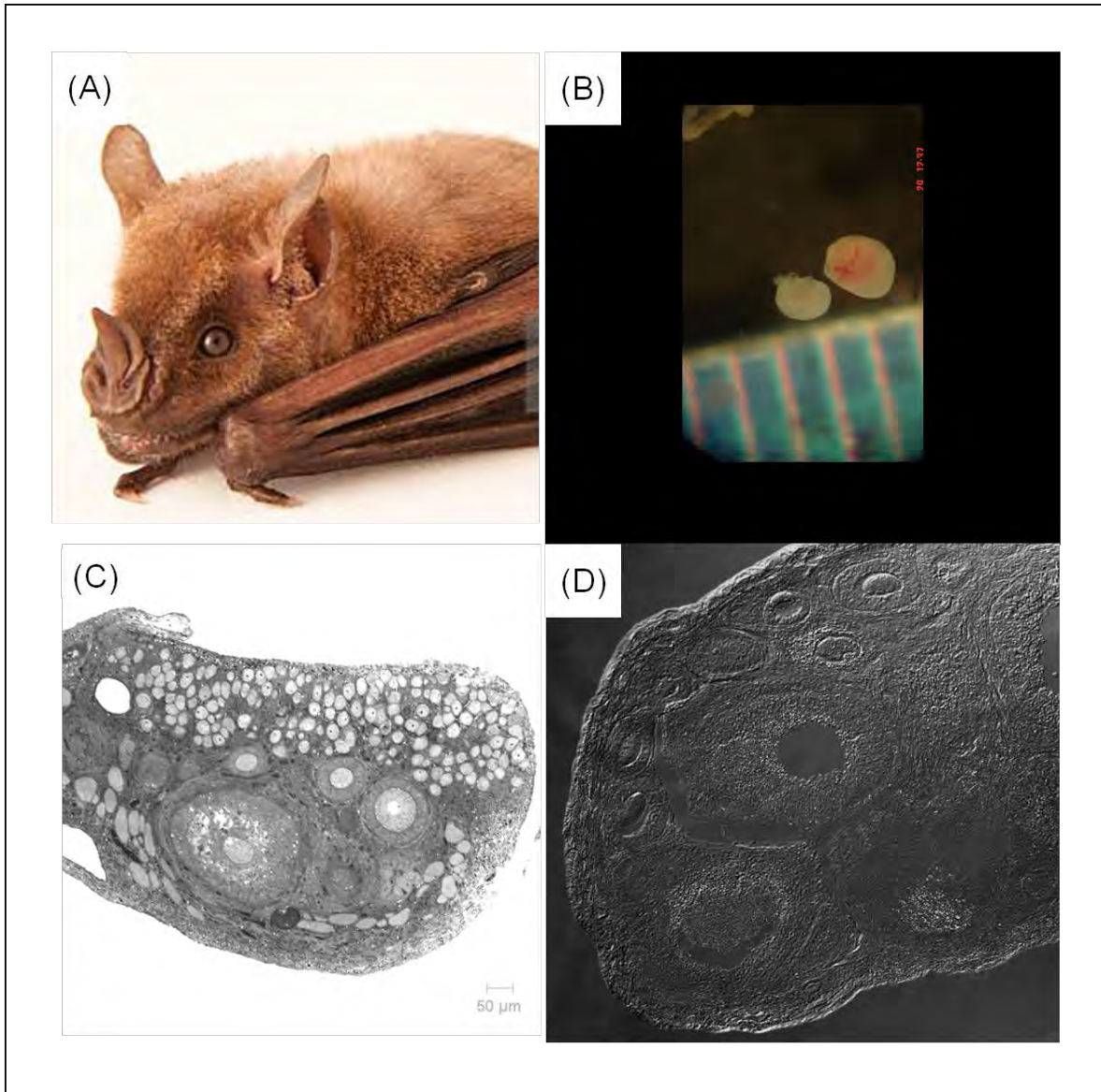


Figura 22. (A) Murciélago filostómico *Artibeus jamaicensis*. (B) Se evidencia los ovarios *in situ* de este murciélago los cuales son negativo a PVF, (C) se presentan cortes histológicos del ovario adulto compuesto por folículos en diferentes grados de desarrollo y por CGCA. (D) se muestra el ovario negativo a PVF.

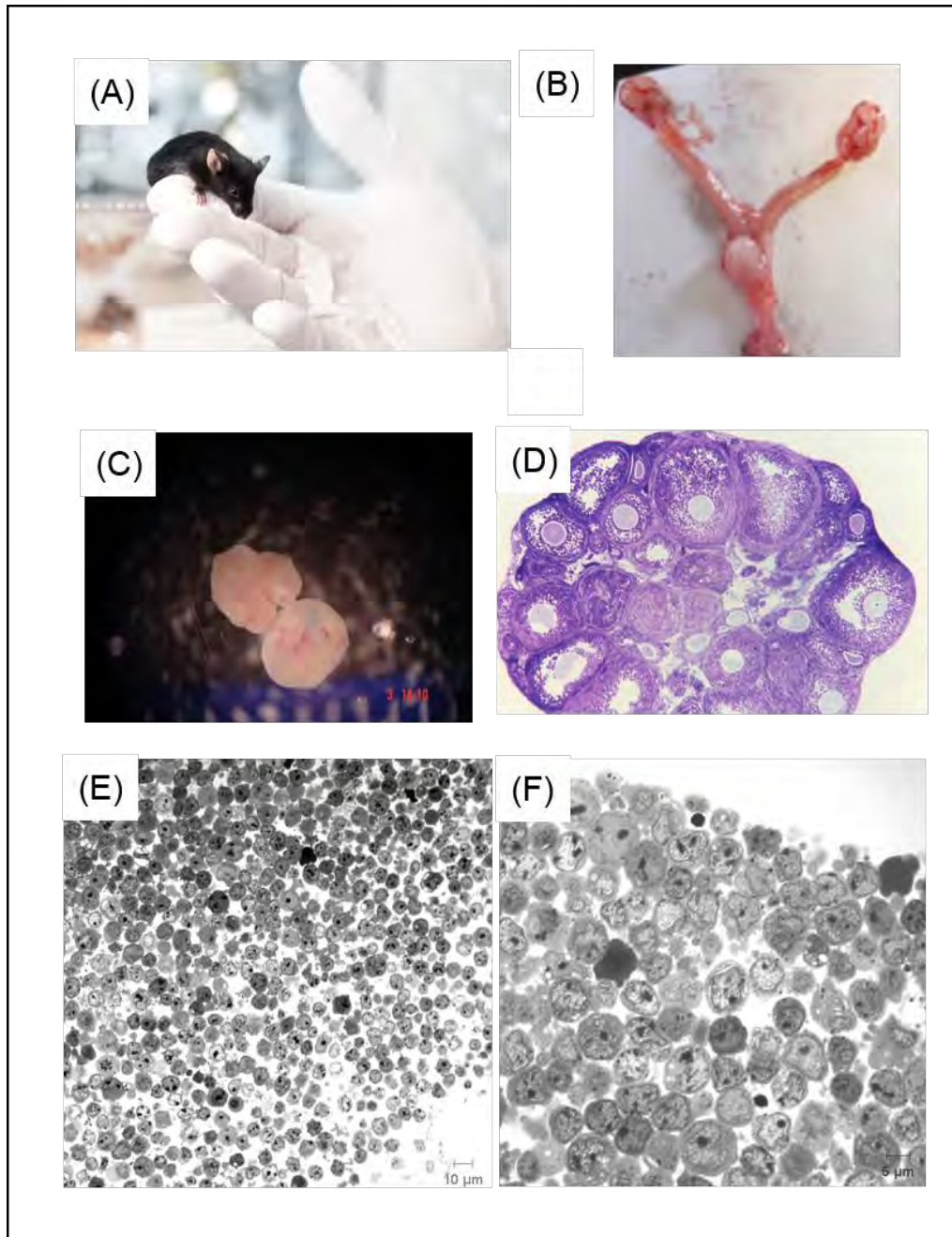


Figura 23. Disgregado celular de ovario de ratón B6B5/EGFP. (A) Fotografía de una hembra adulta. (B). tracto reproductor de ratón formado por un útero bicorne, una vagina y dos ovarios. (C) se presenta un corte histológico de ovario teñido con Hematoxilina y Eosina donde se observan folículos en diferentes estadios de desarrollo distribuidos en todo el ovario, (E y F) se muestra el disgregado celular del ovario donde se células aisladas y no se observan estructuras típicas del ovario.

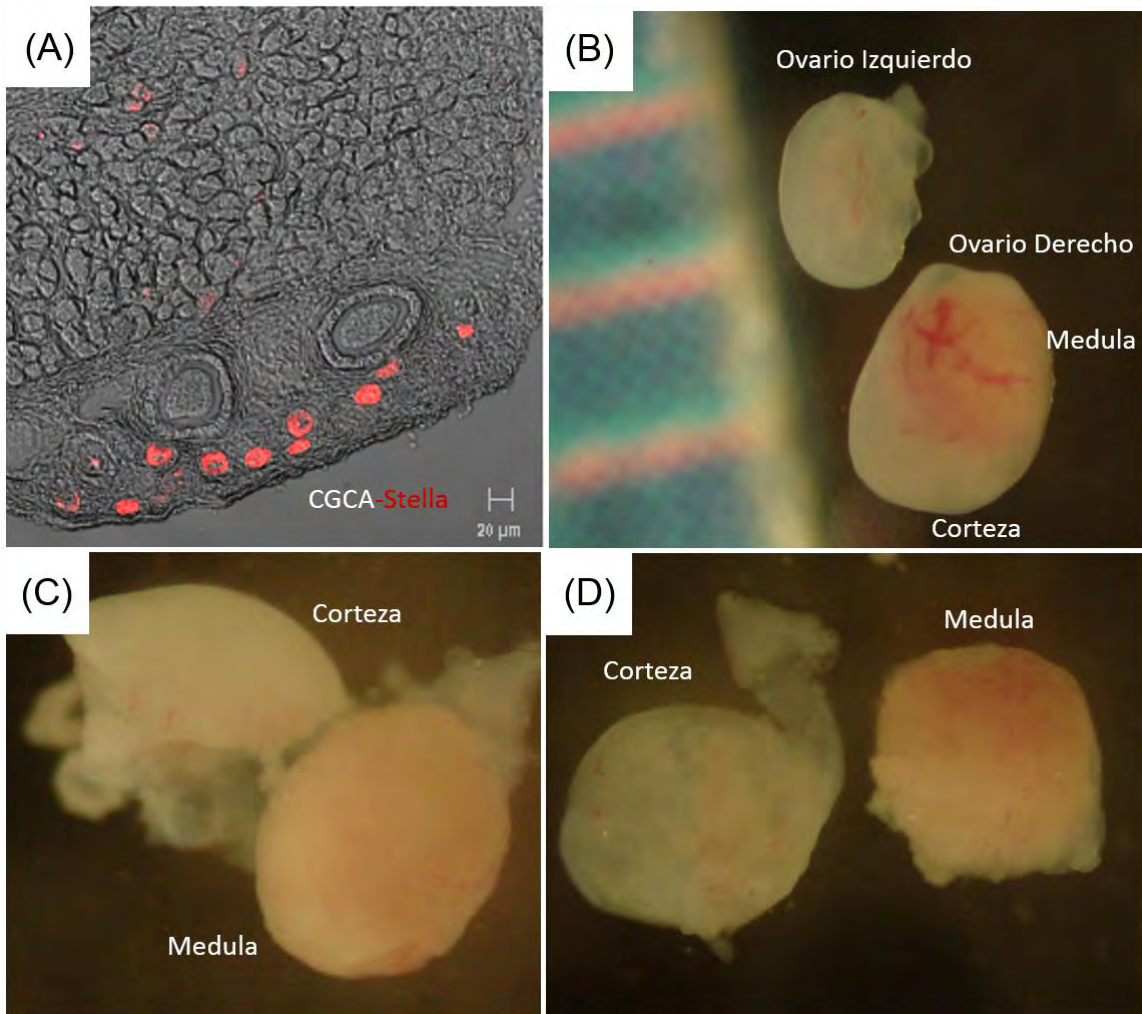


Figura 24. Observaciones *in situ* de ovarios de murciélago *Artibeus jamaicensis*. (A) se muestran que las CGCA se encuentran exclusivamente en la región cortical las cuales son positivas a **Stella**. (B) Se muestra que el ovario derecho es de mayor tamaño donde se observa claramente una regionalización, se muestra una región medular y una región cortical que se torna más transparente formando una media luna. (C y D) se muestran la región cortical separada de la región medular.

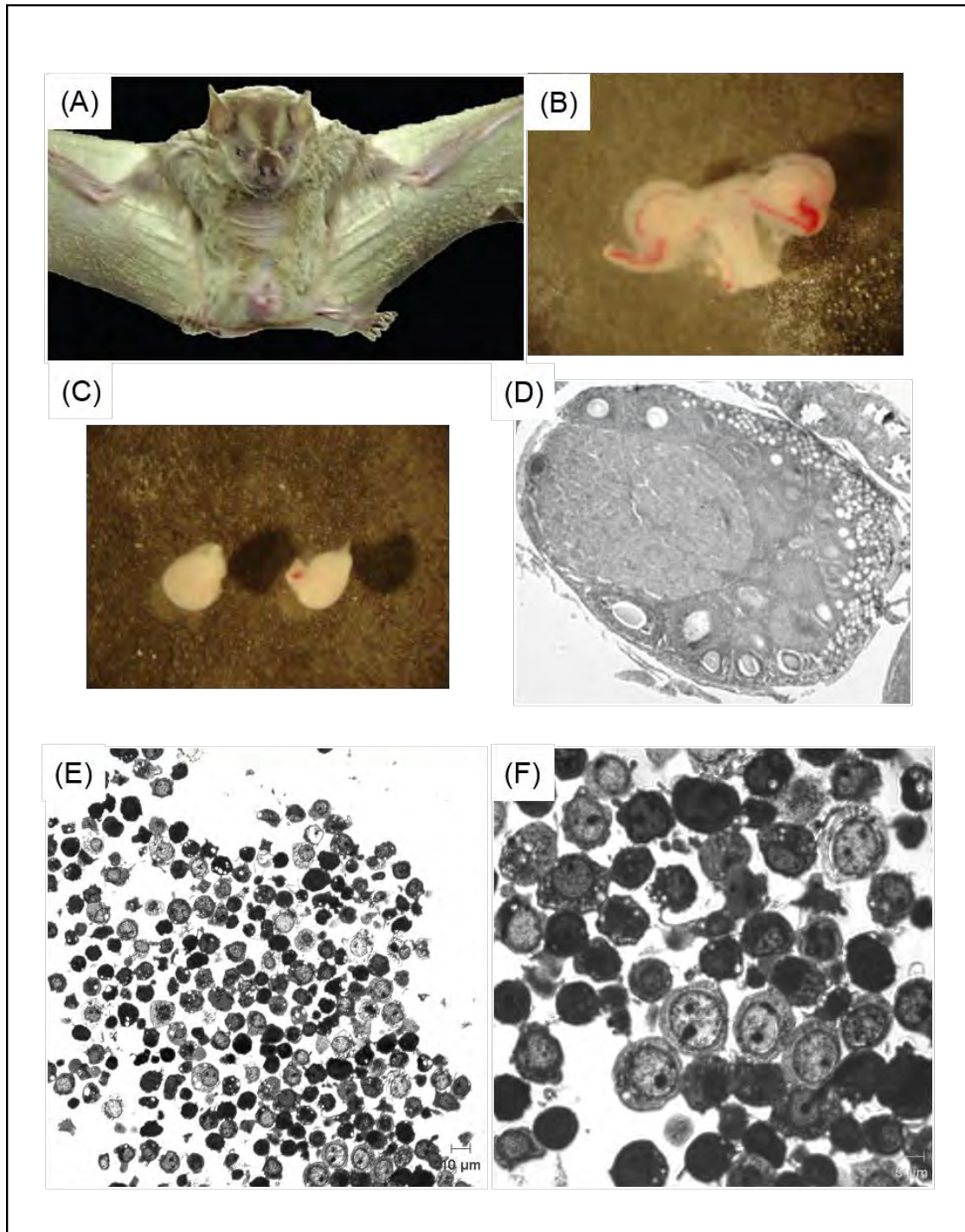


Figura 25. Disgregado celular de ovario de murciélago *Artibeus jamaicensis*. (A) Fotografía de una hembra adulta. (B). tracto reproductor femenino formado por un útero simple, una vagina y dos ovarios. (C) se presenta un corte histológico de ovario en donde se observa la marcada regionalización localizando en la región cortical exclusivamente a los folículos en diferentes estadios de desarrollo y en la región medular la presencia de cuerpo lúteo vasos sanguíneos y tejido mesenquimático. (E y F) se muestra el disgregado celular del ovario, se observan células aisladas.

De esta manera, se obtuvieron dos fracciones celulares, una fracción enriquecida de células somáticas (fracción celular negativa a fosfatasa alcalina) donde se identificó varios tipos celulares como eritrocitos, células de la granulosa y células de la teca. Por otra parte, se obtuvo una fracción enriquecida de células germinales (fracción celular positiva a fosfatasa alcalina) donde observamos ovocitos y CGCA (Figura 27). Ambas fracciones celulares fueron caracterizadas con microscopía de campo claro y microscopía electrónica de transmisión.

Con el uso de microscopía electrónica se observaron cúmulos de perlas magnéticas unidas a posibles células germinales purificadas con fosfatasa alcalina, así como una morfología característica de una célula germinal primordial, al ser muy redondas y grandes, con un núcleo bien definido, varios nucléolos y mitocondrias de crestas tubulares (Figura 28).

7.13 Disgregados-Reagregados celulares (DR)

7.13.1 Ovario de murciélago *Artibeus jamaicensis*

Partiendo de una disgregación celular y su posterior reagregación mediante una suave centrifugación y manteniendo el botón celular obtenido en cultivo de órganos sobre un filtro que forma una interfase líquido gas, el cultivo se fue monitoreando cada 24 horas para documentar su evolución. Observamos que conforme transcurre el tiempo, las células disgregadas sobre el filtro se unen formando agrupaciones tridimensionales (Figura 29).

Transcurridas 96 horas de cultivo se observó la recapitulación de las principales características histológicas del ovario, se identificó células somáticas estrechamente unidas reagrupándose alrededor de células germinales intentando formar folículos ováricos, los cuales son la unidad fundamental del ovario. Estos resultados sugieren que las células se mantuvieron vivas, se pudo observar una reconstrucción de la morfología y a grandes rasgos se pudo ver que no hubo daño celular causado por la manipulación mecánica ni química (Figura 30).

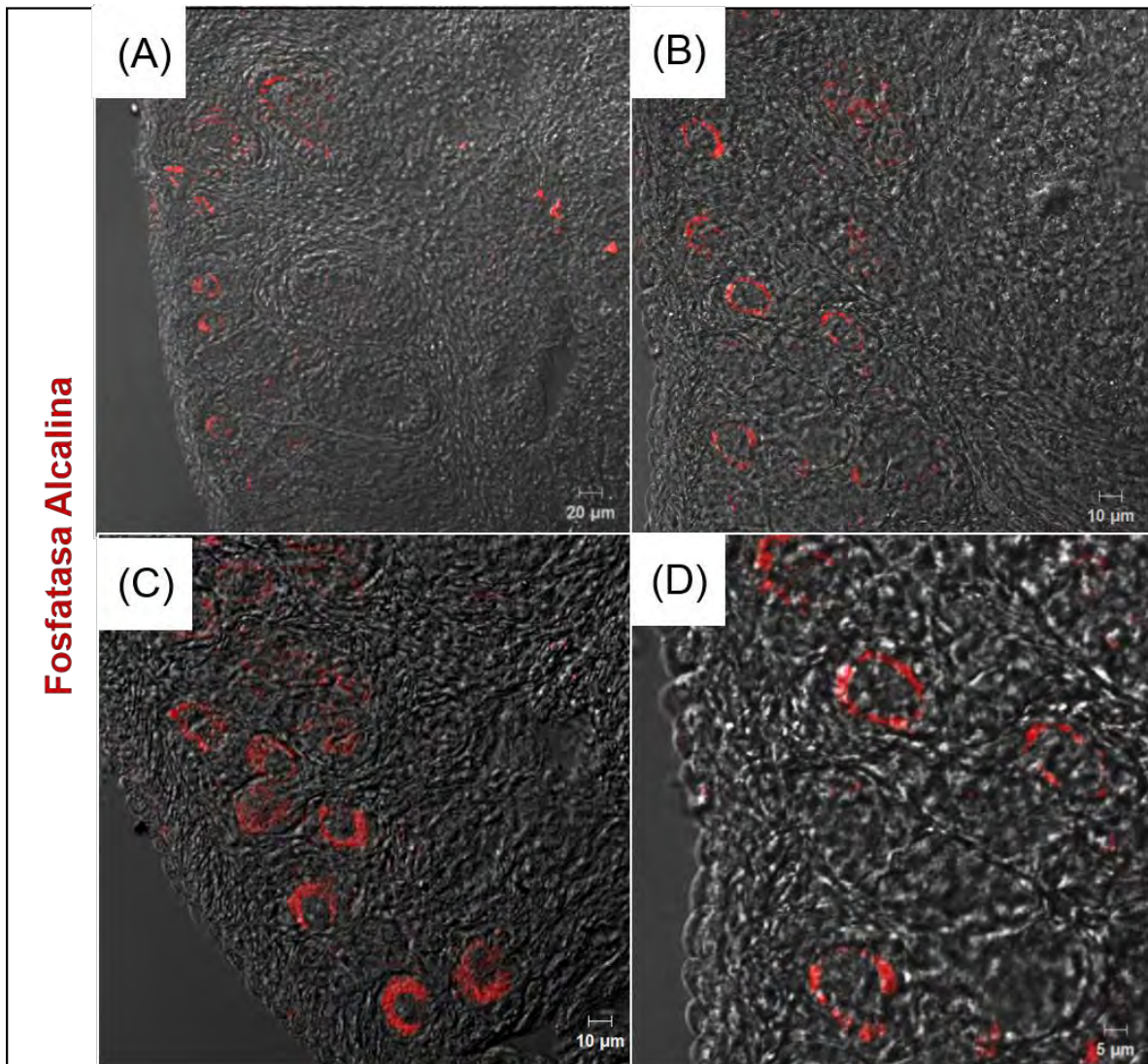


Figura 26. Inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina en el ovario adulto del murciélago *Artibeus jamaicensis*. Se observa la expresión de fosfatasa alcalina en la superficie de las células germinales localizadas en la región cortical.

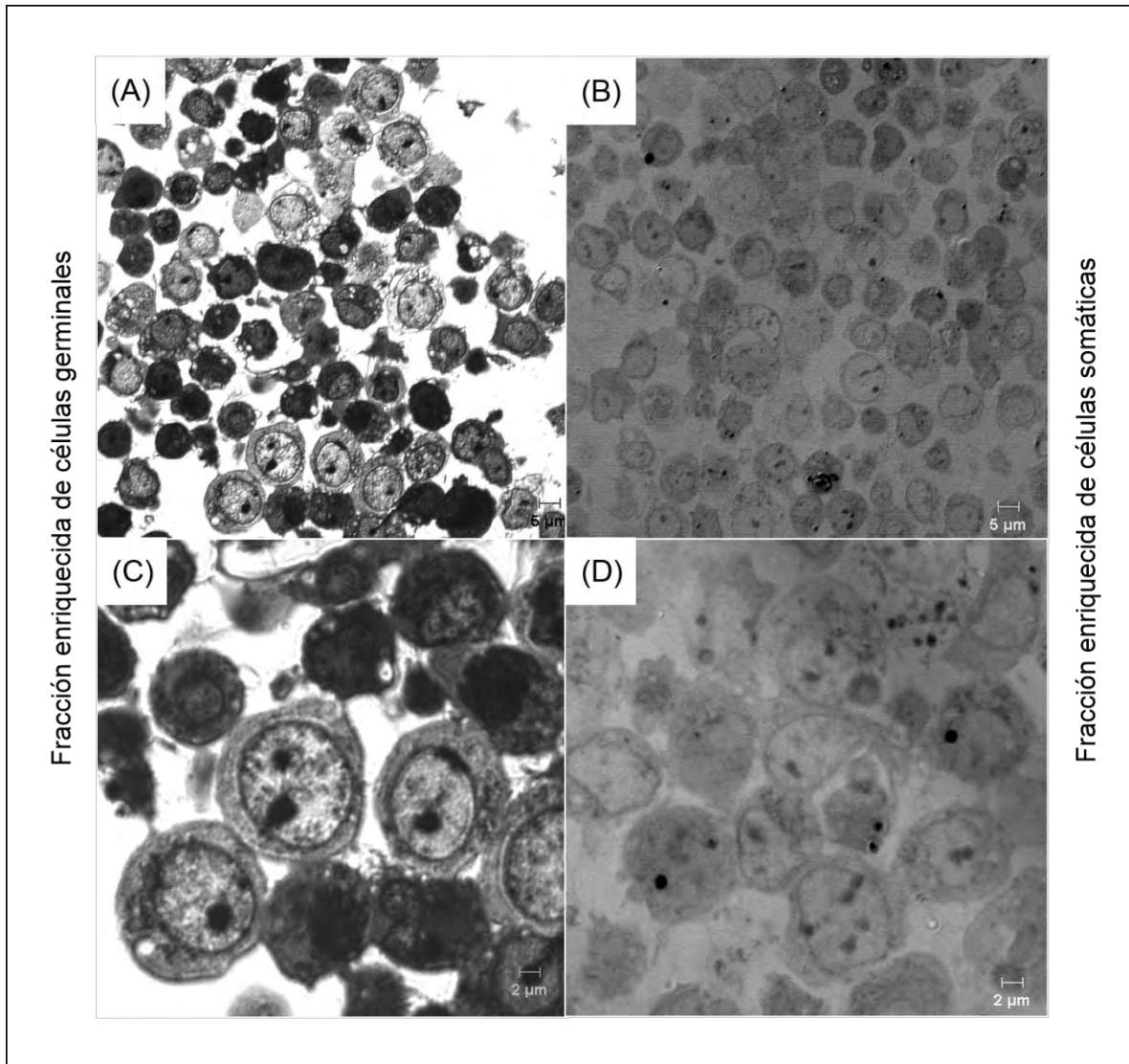


Figura 27. CGCA aisladas con fosfatasa alcalina del ovario derecho del murciélago adulto *Artibeus jamicenesis*. (A y C) se observa una población enriquecida de CGCA la fracción celular positiva a Fosfatasa alcalina. (B y D) se observa un fracción celular enriquecida de células somáticas y algunos ovocitos.

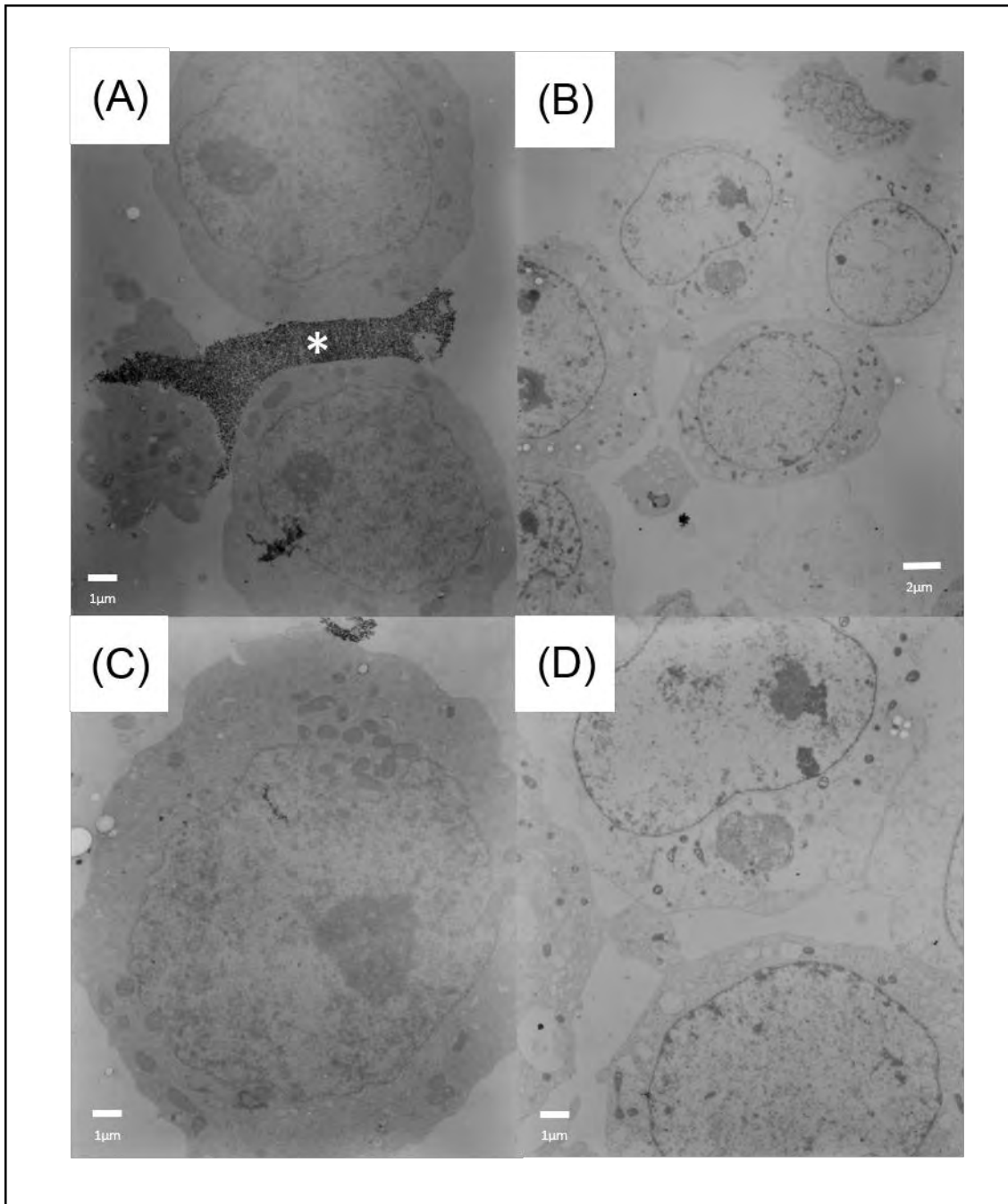


Figura 28. Microscopia electrónica de CGCA aisladas con fosfatasa alcalina del ovario derecho del murciélago adulto *Artibeus jamaicensis*. (A) se observa a dos CGCA unidas por perlas magnéticas (*) las cuales se encontraban acopladas al anticuerpo secundario (C) se muestra una CGCA en donde se puede observar una célula muy redonda grande, con una núcleo bien definido un nucléolo y mitocondrias con crestas tubulares. (B y D) se observan células somáticas del ovario no unidas a perlas magnéticas.

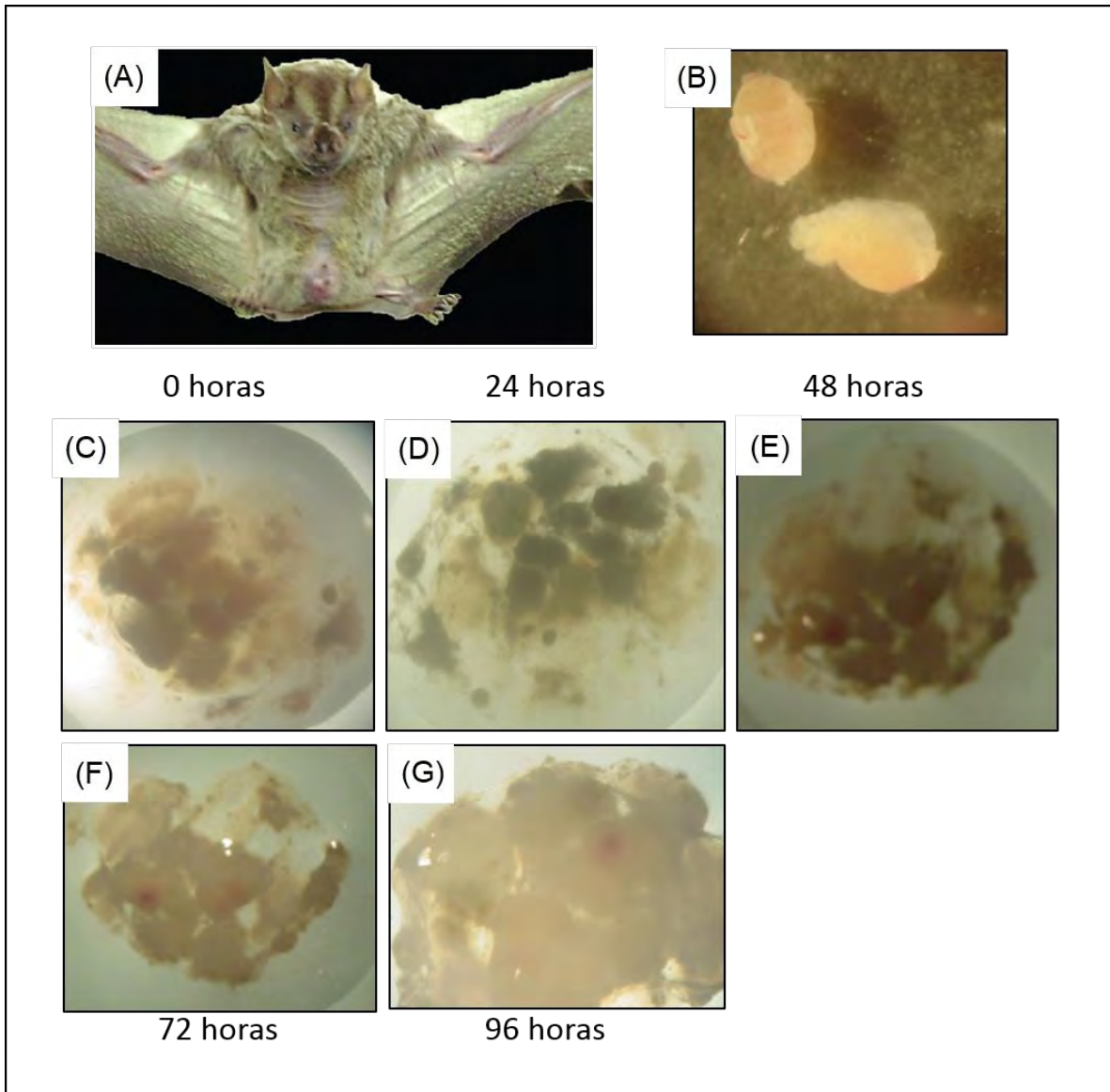


Figura 29. Seguimiento *in vitro* del cultivo celular de un DR de ovario murciélago *A. jamaicensis*. (B) Se muestran los ovarios antes de la disgregación enzimática. Así como la documentación de la evolución del cultivo de órganos cada 24 horas.

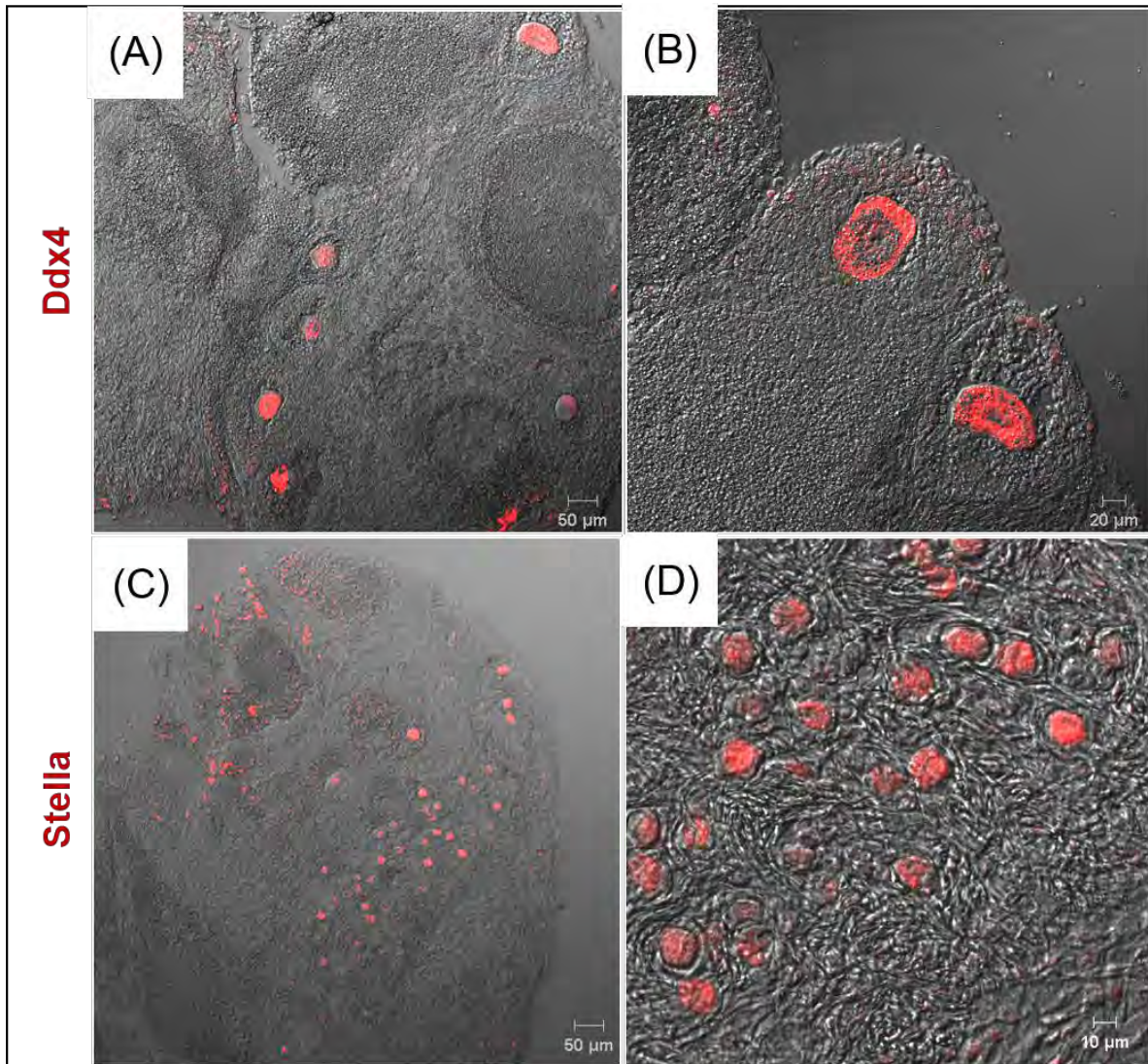


Figura 30. Inmunofluorescencia en un DR de ovario de murciélago *Artibeus jamaicensis*. (A y B) se observa la expresión de ***Ddx4*** en los ovocitos y a grandes rasgos se puede observar la reconstitución de estructuras foliculares. (C y D) se muestra que la expresión de ***Stella*** se restringe a células germinales distribuidas aleatoriamente en el DR las cuales no se encuentran rodeadas de células foliculares.

7.13.2 Ovario de ratón B6B5/EGFP y ovario de murciélago *Artibeus jamaicensis*

La siguiente fase, del trabajo experimental fue evaluar el comportamiento de las CGCA al interaccionar *in vitro* con un ambiente somático no relacionado, se utilizó la disgregación re-agregación celular con la finalidad de mezclar tejido ovárico proveniente del ratón de la cepa B6B5/EGFP con tejido ovárico de la región cortical del ovario de murciélago.

Se monitoreo la evolución del DR celular para observar su comportamiento. Después de la última centrifugación el pellet resultante fue colocado sobre un filtro transparente para mantenerlo en cultivo, este momento es considerado como el tiempo cero, posteriormente el cultivo de órganos fue monitoreado cada 24 horas tomándose fotografías para evidenciar la evolución, al final a las 96 horas el tejido se observó como una estructura cada vez más compacta, (Figura 31).

Transcurridas las 96 horas los cultivos fueron fijados y procesados para inmunofluorescencia, técnica por la cual podemos distinguir las dos poblaciones celulares. Las células pertenecientes al ratón (verdes por la expresión de la PVF) y células pertenecientes a murciélago (no verdes). De esta forma a través de microscopia confocal determinamos si hubo interacciones entre los linajes celulares de estas dos especies de animales (Figura 32). Además, de si estas células permanecían vivas por la expresión de marcadores y si era posible llevar a cabo una reconstitución en cierto grado del órgano.

Determinamos que las células del ovario de murciélago y de ratón interaccionan entre si formando uniones estrechas y compartimentos, eventos evidenciados por la expresión de **Conexina 43 (CX43)** y **Laminina** (Figura 33), esta última también evidenció la reconstitución de las láminas basales. La expresión de **CX43** nos indica que existe una interacción celular entre las células de la granulosa que conforman a los folículos quiméricos. Dentro de los DR los ovocitos de murciélago fueron capaces de formar folículos en su mayoría secundarios al rodearse de

células foliculares provenientes de ratón. De la misma manera, se encontraron folículos formados por ovocitos que acarrean la PVF rodeados por células de la granulosa tanto de murciélago como de ratón. Observamos que bajo nuestras condiciones de cultivo las células ováricas permanecen viables, evidenciado por la expresión del factor de proliferación **pH3** manteniendo actividad celular necesaria para su supervivencia y manteniendo del arreglo ovárico (Figura 34).

Con base en estos resultados se analizó la expresión de marcadores específicos para las CGCA en estos DR y se observó que el gen **Stella** se restringió a las células germinales de murciélago (Figura 35). **Ddx4** se observó en células germinales de ambas especies que confirma el resultado esperado por ser un marcador evolutivamente conservado de este linaje celular (Figura 36).

7.13.3 Disgregados-reagregados de ovario de ratón y CGCA de murciélago

Para valorar la capacidad de las CGCA de responder a un ambiente somático no relacionado (ratón) y determinar si su comportamiento se modifica al interactuar con células somáticas de ovario de ratón, se analizó la expresión de los genes **Ddx4** y **Stella**, en los DR de CGCA aisladas mezcladas con células disgregadas de ovario de ratón B6B5/EGFP.

En la figura 37 en el panel A y B se muestra un panorama general de un DR donde se observa un ovocito positivo a **Ddx4** en la parte superior de la imagen perteneciente al murciélago rodeado por varias capas de células verdes, evidencia de que existe interacciones celulares. En las figuras 37 C y D se muestran la expresión de **Ddx4** en células germinales de murciélago de menor tamaño restringidas a la región periférica las cuales no se encuentran rodeadas de células somáticas.

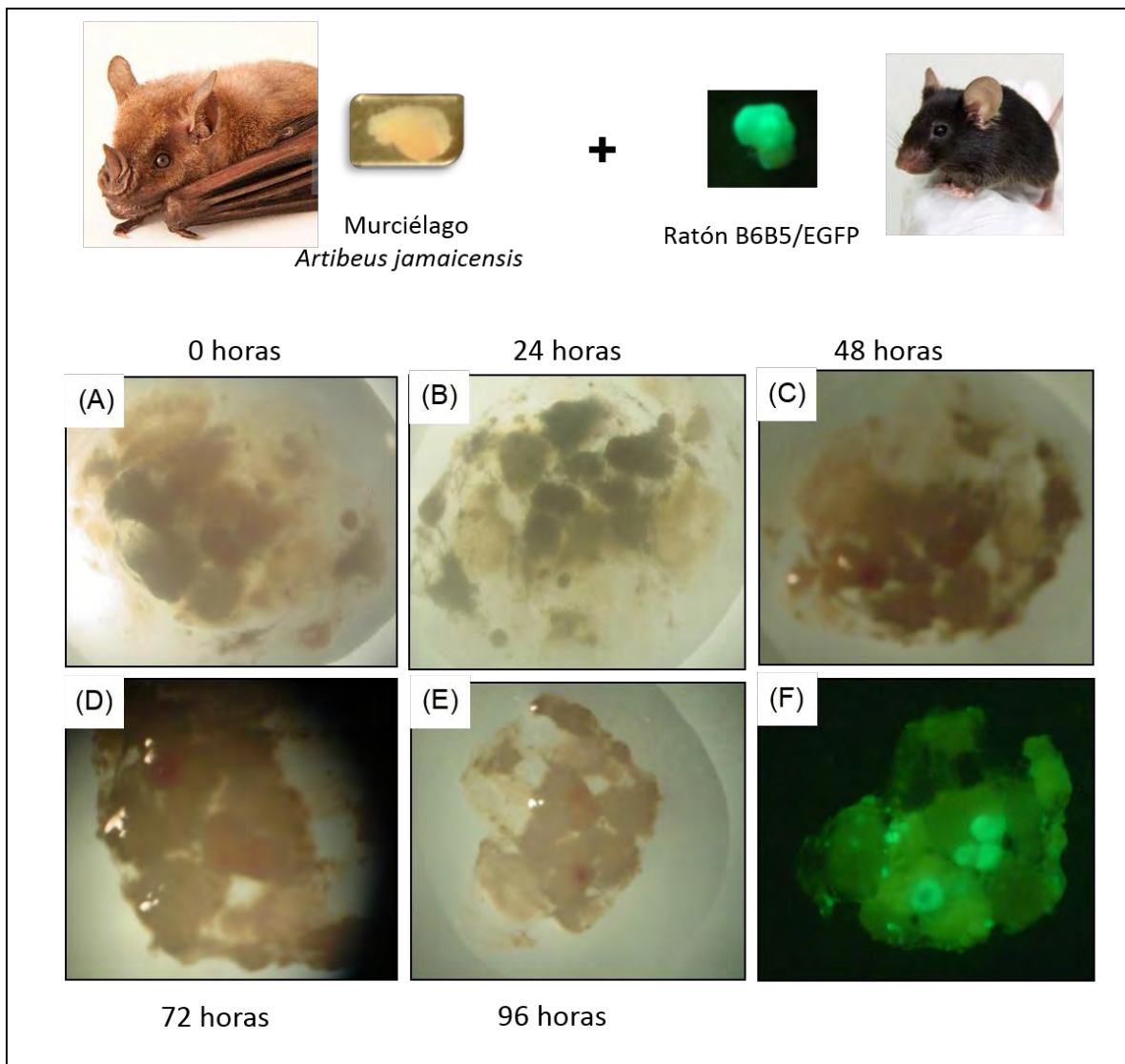


Figura 30. Monitoreo *in vitro* del cultivo de órganos de un disgregado-reagregado de ovario de ovario de ratón B6B5/EGFP y ovario murciélago *A. jamaicensis*. Se muestran los ovarios de ambas especies de mamíferos antes de la disgregación enzimática. El monitoreo cada 24 horas, y bajo la luz ultravioleta a las 96 horas donde se muestra la expresión de la PVF proveniente del tejido ovárico de ratón.

En este tipo de DR donde se mezclaron CGCA con ovario de ratón, observamos que la expresión de **Stella** se reduce significativamente y se restringe exclusivamente a células de murciélago. Debemos resaltar que estas células positivas a **Stella** no se encuentran rodeadas de células somáticas y se distribuyen aleatoriamente en todo el DR, por lo que son consideradas como CGCA, las cuales mantienen su identidad aun después de haber sido disociadas y reagregadas (Figura 38).

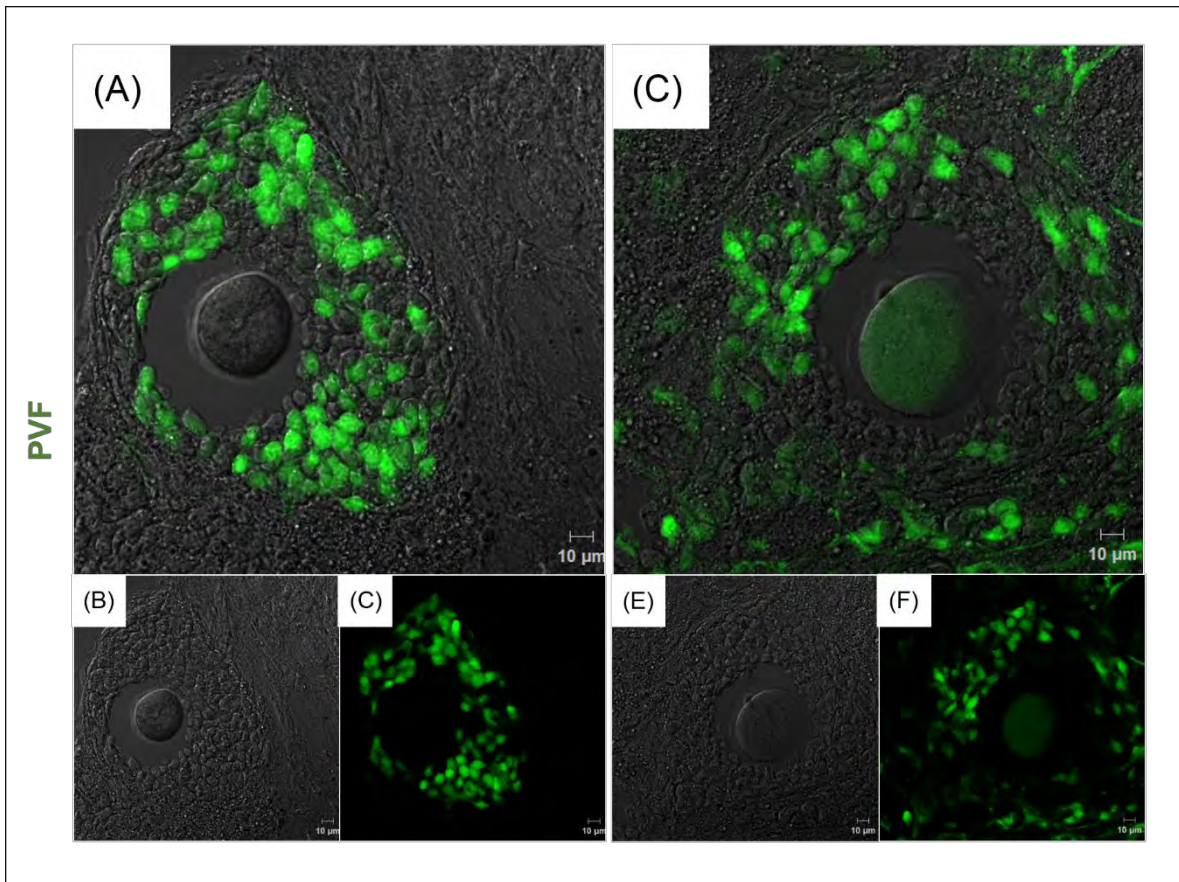


Figura 32. Formación de folículos quiméricos xenogénicos. Compuestos de células somáticas de ratón y murciélago. (A) Ovocito de murciélago rodeado por células foliculares verdes y no verdes. (B) Nomarski (C) Células foliculares positivas a PVF. (D) ovocito de ratón (verde) rodeado de células somáticas de ambas especies. (E) Nomarski (F) Ovocito y células foliculares positivas a PVF.

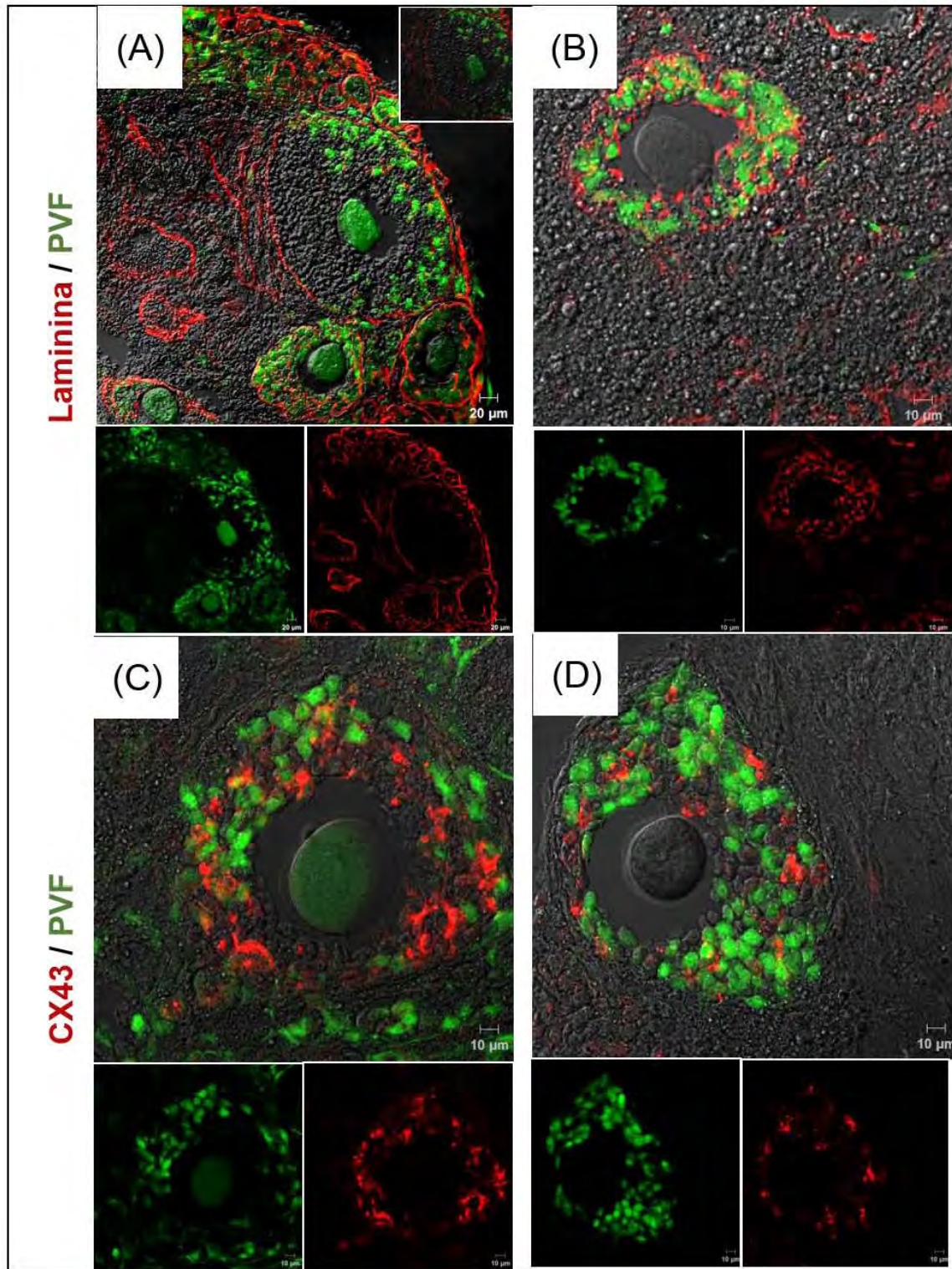


Figura 33: Inmunofluorescencia de un DR de ovario de ratón B6B5/EGFP y Ovario de murciélago después de 96 horas de cultivo. (A y B) Mostrando que la expresión de **Laminina** entre células somáticas de ratón y murciélago que forman un folículo quimérico. (C y D) Se muestra la expresión de **CX43** la cual delimita los folículos evidenciando la restructuración de las láminas basales.

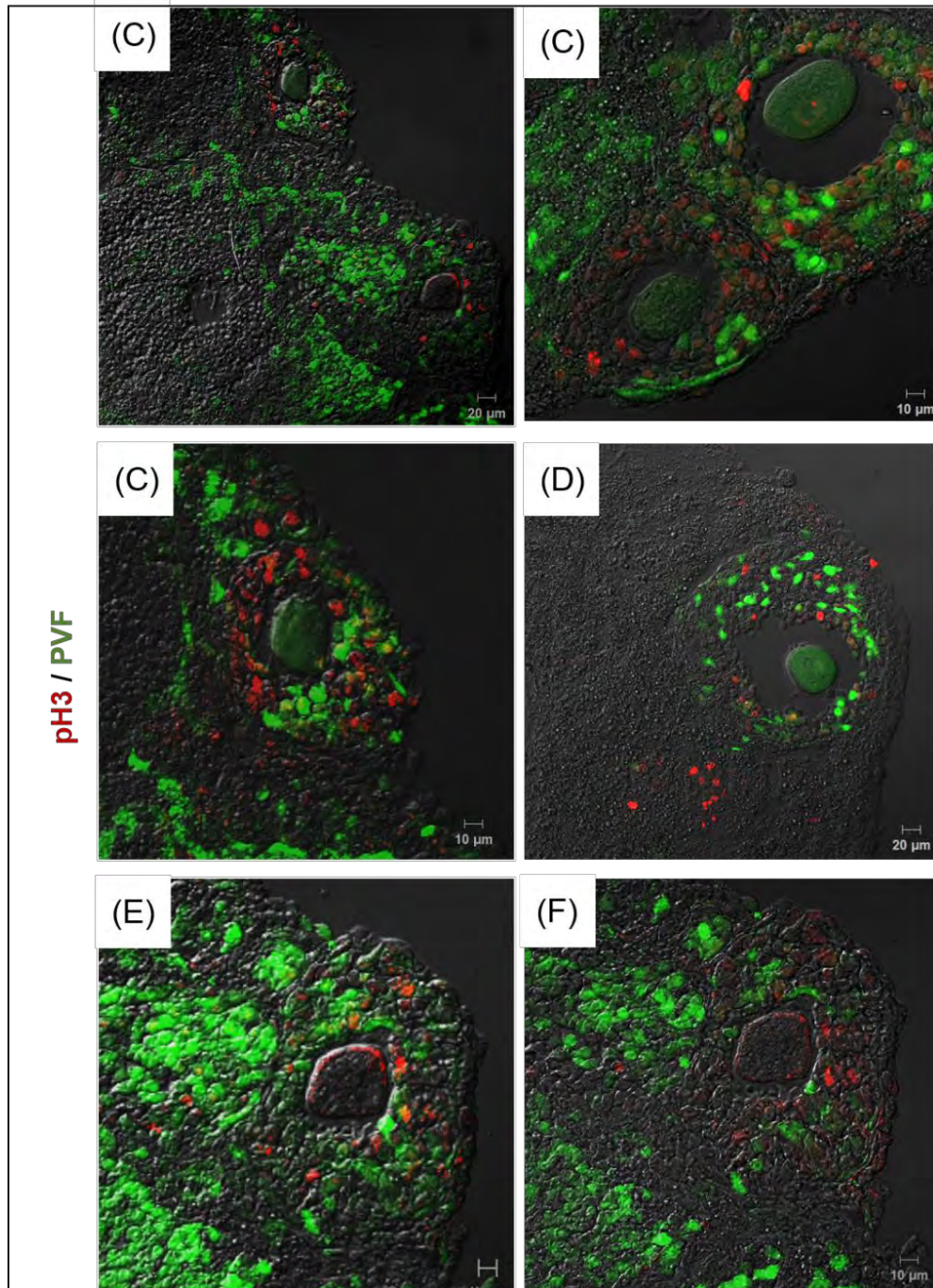


Figura 34. Inmunolocalización del marcador de proliferación celular Fosfo-Histona 3 (pH3). (A) se observa la presencia de dos folículos quiméricos, en la parte superior se observa un ovocito verde con células somáticas de murciélago positivas a pH3 y en la parte inferior un ovocito de murciélago (no verde) rodeado de células somáticas de ratón y murciélago. (B) Se muestran dos ovocitos de ratón formando folículos quiméricos (C y D) se observa ovocitos de ratón formando un folículo quimérico con células somáticas de murciélago. (E y F) se muestra un aumento de ovocitos de murciélago rodeados de células somáticas verdes y no verdes algunas de ellas en proliferación.

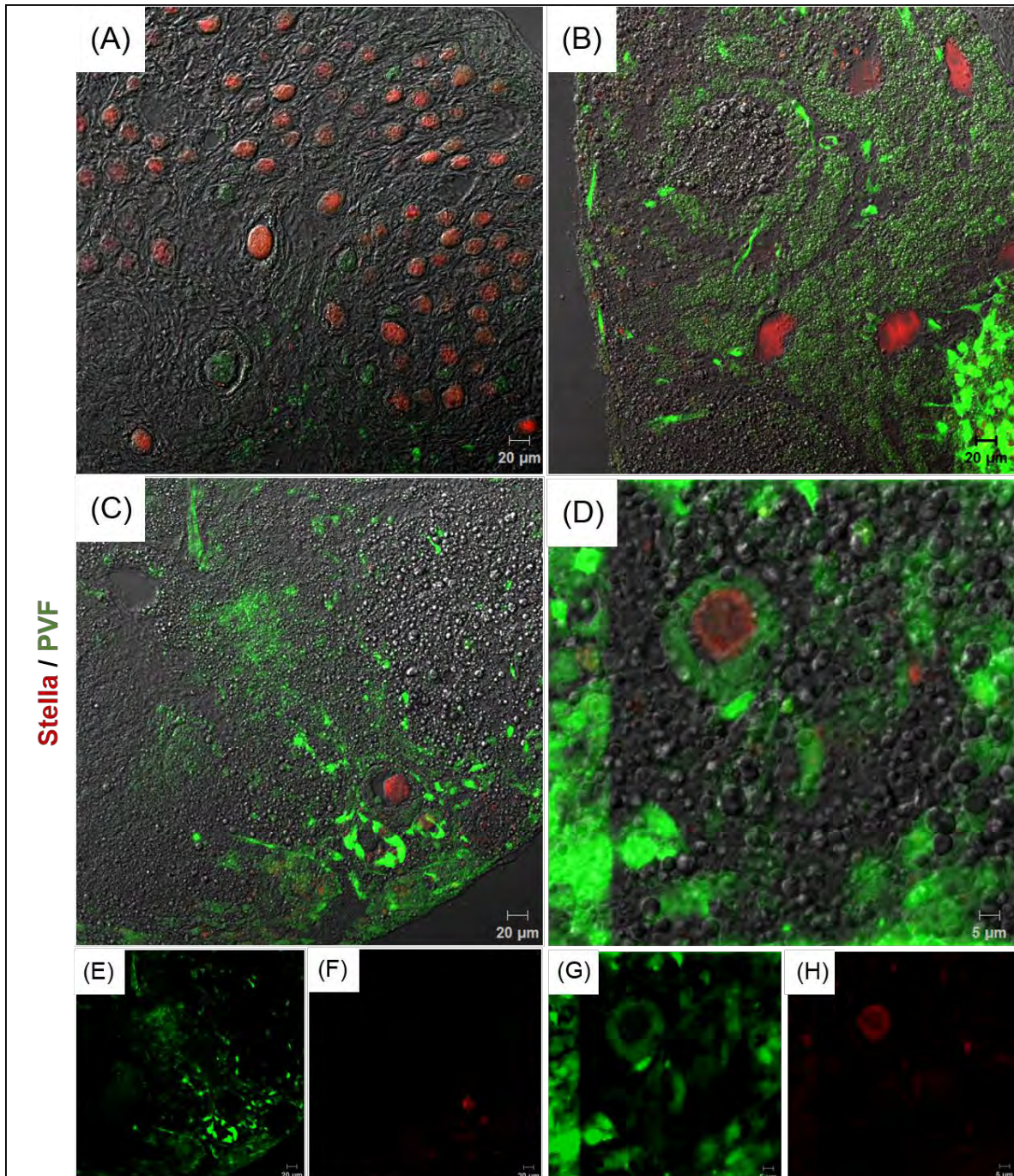


Figura 35. Inmunodetección de la proteína del gen *Stella* en un DR cultivado 96 horas. (A y B) Se observa la expresión de **Stella** en células de murciélago. (C) se muestra una célula positiva a **Stella** localizada en la región cortical. (D) Se observa una célula de murciélago **Stella** positiva la cual está rodeada por una capa de células de ratón.

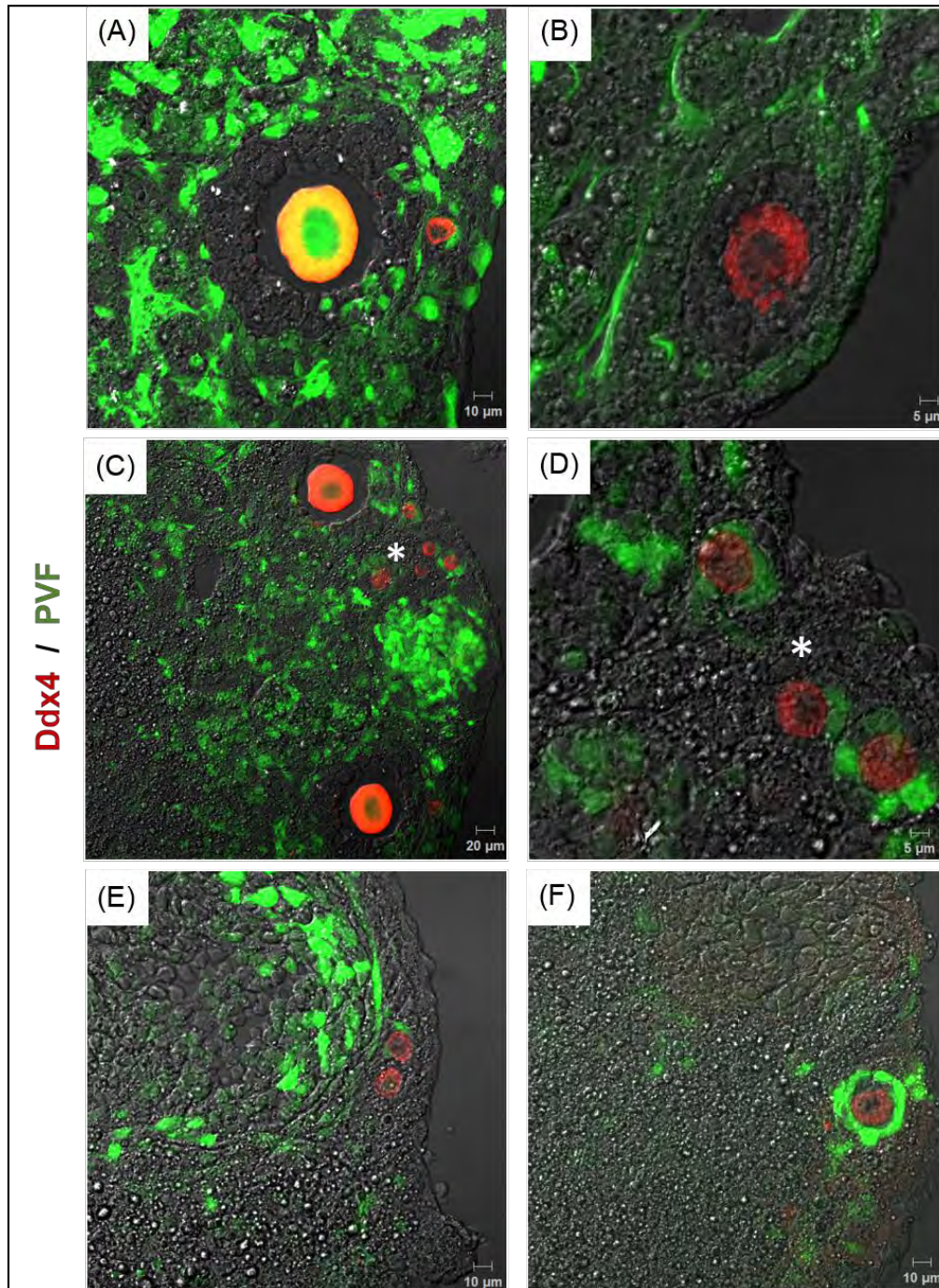


Figura 36. Inmunolocalización de la proteína del gen *Ddx4* en un DR de ovario de ratón y murciélago. (A) Se aprecia un ovocito de ratón y (B) un ovocito de murciélago expresando citoplasmáticamente *Ddx4*, en ambos casos se observan rodeados de células foliculares de ambas especies reconstituyendo una estructura parecida a un folículo. (C) se observa la expresión de *Ddx4* en ovocitos de ratón y en células de menor tamaño localizadas en la periferia del DR (*), (D) se observa a mayor aumento las células periféricas (*) donde se puede apreciar que algunas de ellas comienzan a rodearse de células somáticas de ratón. (E) se muestran dos células corticales positivas a *Ddx4* sin células somáticas alrededor. (F) se observa una célula cortical rodeada de células somáticas formando un folículo primordial.

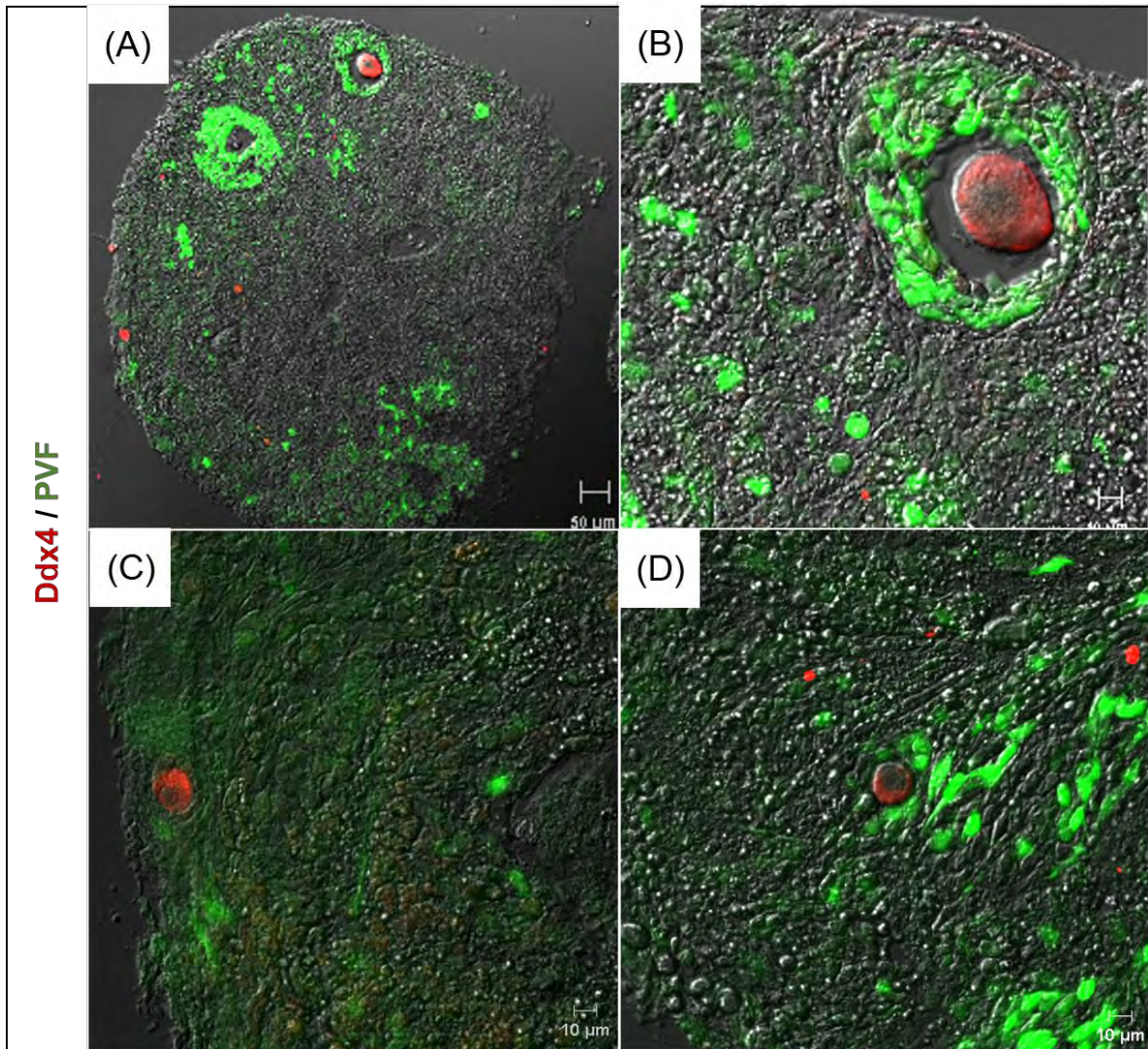


Figura 37. Inmunofluorescencia de un DR de ovario de ratón B6B5/EGFP y las CGCA aisladas de la región cortical del ovario del murciélago *A. jamaicensis* después de 96 horas de cultivo se muestra la expresión ***Ddx4*** marcador característicos de línea germinal. (A) Panorama general del reagregado, (B) un aumento de un folículo quimérico donde el ovocito presenta una marca citoplasmática de ***Ddx4***. (C y D) se muestra CGCA positivas a ***Ddx4***.

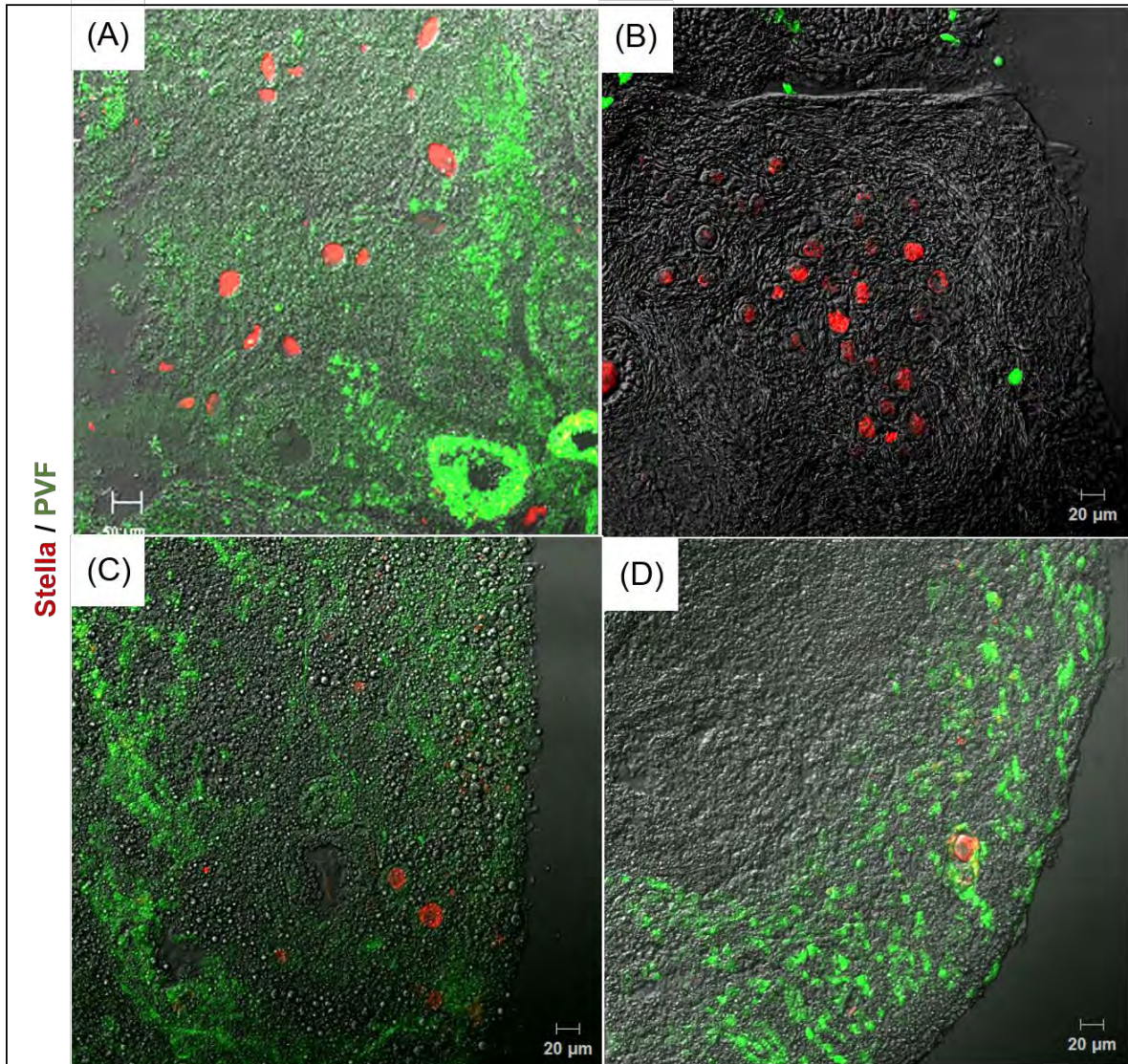


Figura 38. Inmunolocalización de la proteína del gen *Stella* en un DR de ovario de ratón B6B5/EGFP y CGCA aisladas de la región cortical del ovario del murciélago *A. jamaicensis* después de 96 horas de cultivo. (A y B) Panorama general del DR donde se observa células de murciélago positivas a *Stella*. (C y D) se muestra CGCA positivas a *Stella*.

8. DISCUSIÓN



Los estudios comparativos del desarrollo embrionario entre especies de mamíferos más allá de los modelos clásicos de laboratorio resultan relevantes para ampliar el conocimiento sobre aspectos celulares, fisiológicos y moleculares relacionados con la biología del desarrollo en vertebrados. Dentro de este contexto, los mecanismos de determinación y diferenciación sexual, así como el establecimiento de la línea germinal en la gónada han sido ampliamente estudiados en algunos mamíferos como el humano, el ratón y la rata encontrándose pocas diferencias en estos procesos. De acuerdo con lo anterior, resulta relevante dilucidar estos aspectos de la diferenciación sexual en otras especies de mamíferos sobre todo de fauna silvestre donde el conocimiento es prácticamente nulo. Por lo tanto, el presente trabajo trata de un estudio donde se describen por primera vez a nivel morfológico las principales etapas de desarrollo gonadal y la diferenciación morfológica de ovarios y testículos en quirópteros empleando al murciélago filostómido *Sturnira lilium* como modelo.

Se ha observado que las diferentes especies de quirópteros han adquirido durante su evolución diferentes estrategias de reproducción de acuerdo con el lugar donde habitan. Sin embargo, a pesar de que las diferentes especies de murciélago enfrentan diferentes adaptaciones ambientales, algunos procesos involucrados en las funciones fisiológicas de sus órganos reproductores, así como sus patrones de reproducción son similares a otros mamíferos, asemejándose más a los humanos que a los roedores ([Campos et al., 2014](#)). Al respecto, dentro de las estrategias reproductivas de los murciélagos no se puede hablar de un patrón de reproducción típico debido a que las diferentes especies enfrentan condiciones ambientales variables, por lo que han desarrollado diversas adaptaciones morfológicas e incluso novedosas conductas reproductivas ([Rasweiler, 1993](#)). En el caso particular de *Sturnira lilium*, estos quirópteros presentan un patrón de reproducción

poliéstrico bimodal, generando descendencia solo dos veces por año, además solo nace una cría y ocasionalmente dos. El tracto reproductor de las hembras, al igual que el del resto de los mamíferos, consta de dos ovarios, dos oviductos, útero, cérvix y vagina. Sin embargo dentro de este esquema tradicional se pueden presentar diversas adaptaciones anatómicas y fisiológicas (Wimsatt, 1975, 1979). La funcionalidad de los ovarios es variable en los murciélagos, aunque la mayoría presenta actividad ovárica en ambos ovarios, algunas especies pueden ovular consistentemente desde uno solo, por lo que el ovario funcional suele ser de mayor tamaño (Rasweiler, 2000, Antonio *et al.*, 2013).

8.1 Establecimiento de las etapas de desarrollo

El desarrollo de murciélagos, permanece relativamente sin estudiar, Cretkos fue uno de los pioneros en describir e ilustrar una serie de etapas del desarrollo embrionario del murciélago frugívoro de cola corta *Carollia perspicillata*. Este reporte ofrece una atractiva opción para determinar los estadios de desarrollo del murciélago de charreteras *Sturnira lilium*, proporciona un marco para estudiar la embriogénesis, facilitando información para correlacionar el desarrollo embrionario con el desarrollo gonadal, mediante una estratificación basada en criterios morfológicos que minimizan los efectos de variabilidad y grado de desarrollo entre los individuos, esto cuando se desconoce la fecha exacta de la concepción, facilitando la comparación con diferentes especies de murciélagos.

Los estadios del desarrollo se establecieron en base a observaciones morfológicas y a características tales como el tamaño, el número de somitas y en etapas más avanzadas por el desarrollo de las extremidades. Ya que la característica morfológica más evidente de los murciélagos son las alas, este es un buen parámetro que permite establecer con mayor precisión el estadio de desarrollo. Los murciélagos son una buena alternativa a los modelos clásicos de laboratorio, ya que son de fácil cría en el laboratorio y las estrategias reproductivas y de desarrollo son más parecidas al humano que los roedores, lo que en términos

comparativos los hace un mejor modelo ([Barnard, 2005](#)). Las similitudes existentes entre los murciélagos, humanos y los roedores en términos comparativos pueden contribuir al conocimiento dentro del campo de la determinación y diferenciación sexual gonadal. Una de las principales interrogantes dentro de este campo se refiere a la fisiología de las células germinales primordiales (CGPs), las cuales han sido ampliamente estudiadas en modelos clásicos de laboratorio abarcando los cinco grupos de vertebrados, observándose diferencias principalmente en su conducta migratoria, tiempo de colonización de las gónadas y diferenciación sexual hacia ovocitos y espermatogonias entre los diferentes grupos ([De Felici, 2016](#)).

8.2 Determinación del sexo cromosómico

La regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario temprano requiere de múltiples y ordenados procesos epigenéticos que garanticen una correcta diferenciación y proliferación celular. La inactivación del cromosoma X es un proceso multiepigenético estrechamente ligado al desarrollo embrionario, que involucra el silenciamiento transcripcional de uno de los dos cromosomas X en las células de las hembras en mamíferos. El modelo embrionario mejor estudiado es el de ratón, donde se observan ciclos de inactivación y reactivación durante la formación del trofoectodermo y el epiblasto ([Acosta *et al.*, 2013](#)). En los mamíferos el sexo es determinado por la combinación de los cromosomas X y Y, desarrollándose hembras con la combinación XX y machos con la combinación XY. Esta diferencia representa un problema para el desarrollo normal, ya que las hembras teóricamente duplicarían la expresión génica del X frente a los machos. Para solucionar esta desigualdad, se desarrolló un sistema de compensación de dosis, en la cual las hembras inactivan transcripcionalmente la mayoría de los genes en uno de los dos cromosomas X en todas sus células. Este sistema de compensación iguala la expresión de genes del cromosoma X en machos y hembras asegurando que solo un cromosoma X funcione en ambos sexos ([Turner, 2007](#); [Lin *et al.*, 2007](#)). Este proceso de inactivación del cromosoma X, produce la

condensación de la cromatina sexual, esta cromatina se visualiza en la superficie interna de la membrana nuclear, este evento permite determinar muy temprano en el desarrollo el sexo del embrión cuando es imposible distinguir fisiológicamente y morfológicamente un macho de una hembra, este hecho facilita el sexado de embriones ya que es un patrón repetitivo que se establece en mamíferos con un sistema genético XX / XY.

8.3 Migración de las células germinales primordiales y formación de la gónada indiferenciada

En el caso del murciélago *S. liliium* y al igual que la mayoría de los mamíferos, observamos que las CGPs en etapas tempranas del desarrollo (estadios 11 al 17) presentan características migratorias debido a su origen extraembrionario que las condiciona a ser acarreadas pasivamente, o a valerse de su propia capacidad de locomoción para llegar a las crestas genitales. Al igual que en el ratón, la rata, el conejo y el humano; las CGPs migran por el mesenterio intestinal hacia las crestas gonadales en formación y son afines a la proteína del gen ***Ddx4*** característico, de línea germinal en vertebrados e invertebrados ([Tanaka et al., 2000](#); [Wessel, 2016](#)).

Aunque en el presente estudio no se describen todas las etapas del desarrollo embrionario de *Sturnira liliium* de acuerdo con las etapas descritas por [Cretokos \(2005\)](#) para el murciélago *Carollia perspicillata*, logramos describir los principales eventos morfológicos relacionados con la establecimiento de la gónada indiferenciada y su diferenciación hacia un ovario y un testículo; y correlacionar estos eventos con el desarrollo embrionario. Observamos el establecimiento de una gónada indiferenciada en los estadios 13 y 14, ya que en el estadio 11 a pesar de la presencia de CGPs en migración, no se encontró aun la formación de una cresta genital. Estos datos sugieren que la formación de una gónada indiferenciada y su colonización por parte de las CGPs se llevan a cabo entre los estadios 13 y 16 del desarrollo embrionario en *Sturnira liliium*. Como se mencionó, no existen reportes sobre el desarrollo gonadal en quirópteros, sin embargo los

cambios morfológicos y el mecanismo de migración de las CGPs se asemeja fuertemente a lo descrito en otros mamíferos (Ottolenghi *et al.*, 2006; Egger *et al.*, 2014; Carré y Greenfield, 2016).

8.4 Inicio de la diferenciación morfológica de la gónada

Al igual que durante la morfogénesis gonadal de roedores y primates, el inicio de la diferenciación morfológica de la gónada se lleva a cabo en los individuos XY. En *S. liliium*, este proceso se inicia en el estadio 17 y también se da por la separación de los cordones sexuales del epitelio celómico, formándose a sí los cordones testiculares (Pelliniemi y Frojzman, 2001). La diferenciación del linaje de las células de Sertoli también se lleva a cabo en los testículos de *S. liliium*, ya que la expresión de los genes autosómicos **Sox9** y **Mis** se detectó en el núcleo y citoplasma de las células de Sertoli respectivamente de la misma manera a como se ha reportado en roedores (Josso *et al.*, 1998; Moreno-Mendoza *et al.*, 2003). En el caso del ovario en el mismo estadio de desarrollo de cuando se observa el inicio de la diferenciación testicular, este no muestra cambios con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada, solo ha aumentado de tamaño quizás por el incremento en el número de células germinales.

8.5 Diferenciación testicular

El desarrollo testicular es caracterizado por la formación de cordones, los cuales son separados del epitelio celómico debido a la proliferación de vasos sanguíneos y células mesenquimáticas que lo rodean. En cuanto al análisis de expresión de genes se puede confirmar que la expresión de **Sox9**, un gen autosómico relacionado con la determinación sexual masculina y que esta conservado en las diferentes especies de mamíferos se encuentra conservado también en los quirópteros. Además se ha reportado que la sinergia de **Sox9** y **Sf1** inducen la expresión de **Mis** en células de Sertoli, la cual inhibe el desarrollo de los conductos de Müller.

8.6 Diferenciación ovárica

El desarrollo ovárico es mediado por las células germinales, las cuales llevan a cabo una diferenciación fisiológica al iniciar el proceso de meiosis, evento evidenciado por la formación de los complejos sinaptonémico los cuales son estructuras proteicas formadas por dos elementos laterales y uno central que se van cerrando a modo de cierre lo que garantiza el perfecto apareamiento entre los cromosomas homólogos, esta estructura se forma exclusivamente en la fase de zigoteno de la profase I de la primera división meiótica. Los complejos sinaptonémico a nivel de microscopia de alta resolución se pueden observar como escaleras. Son componentes únicos de la línea germinal, formándose exclusivamente durante el desarrollo embrionario en células germinales femeninas, evidenciando morfológicamente la especificación de estas a ovocitos. También cabe resaltar que la entrada en meiosis conlleva al inicio de la foliculogénesis, mecanismo de formación de folículos ováricos los cuales son la unidad fundamental morfológica y fisiológica del ovario.

Estos eventos de la morfogénesis ovárica y testicular, nos permiten sugerir que los mecanismos de determinación y diferenciación sexual son similares a los descritos en organismos modelos como el ratón y la rata, así como también a lo descrito en humanos y otros primates ([She y Yang, 2014](#)).

8.7 Correlación entre el desarrollo de las extremidades y la gónada en ratón y murciélago

De acuerdo con nuestros hallazgos, podemos argumentar que algunos mecanismos relacionados con la determinación y la diferenciación sexual en roedores y humanos son similares con los quirópteros. Sin embargo, las diferencias pueden de hecho establecerse durante el tiempo que estos procesos están teniendo lugar. También podemos indicar que la correlación entre el desarrollo de las extremidades y el desarrollo gonadal es un buen parámetro para

establecer cambios morfológicos en las gónadas de los murciélagos. En este sentido, se ha sugerido que la sincronización relativa y el posicionamiento durante la formación inicial de los dígitos de las extremidades anteriores parece continuar en el murciélago y el ratón y que las diferencias en las extremidades en adultos surgen de diferencias en la morfogénesis durante el desarrollo embrionario (Cretekos *et al.*, 2008).

También se sabe que en el ratón, entre 7.5 y 9.5 *dpc*, las CGPs migran de la línea primitiva al endodermo del intestino posterior, mientras que en *S. lillium* se observan estos mismos eventos entre las etapas 11 y 15; sin embargo, la morfología de los esbozos de las extremidades es muy similar en ambas especies. A los 10.5 *dpc* en el ratón, las CGPs colonizan las gónadas, se acumulan en la membrana basal y se agrupan entre sí y con poblaciones de células somáticas. Estos eventos de morfogénesis gonadal coinciden con los eventos de colonización de las CGPs en las etapas 13 y 14 en el murciélago *S. lillium*. En ambas especies de mamíferos, los esbozos de las extremidades anteriores parecen más grandes, pero todavía no hay evidencia de dígitos. A los 12.0 *dpc*, el comienzo de la diferenciación gonadal sexual masculina en el ratón es evidente, demostrado por el inicio de la formación de los cordones testiculares, después de lo cual se establece un testículo que contiene cordones testiculares (Buehr *et al.*, 1993, Anderson *et al.*, 2000). Durante estas etapas de diferenciación testicular, las extremidades en ambas especies de mamíferos comienzan a presentar características distintivas. Mientras que las extremidades anteriores del ratón tienen una forma angular y las marcas de los dígitos son apenas visibles (Behringer *et al.*, 2013), en *S. lillium*, el pulgar ha comenzado a separarse del segundo dígito. Por lo tanto, desde un punto de vista comparativo, los eventos principales del desarrollo gonadal que conducen a la formación de ovarios y testículos, y su correlación con la diferenciación de las extremidades son similares en el murciélago y el ratón (Figura 39). Esto significa que las características morfológicas del desarrollo de los dígitos de las extremidades anteriores son similares entre las dos especies en términos de cuándo se establece la gónada

indiferenciada y se inicia la diferenciación morfológica de la gónada. Esta similitud corrobora el hecho de que los primeros eventos del desarrollo embrionario son similares entre los vertebrados de mamíferos, y particularmente en este caso, entre los mamíferos con estructuras homólogas, como extremidades y órganos reproductores.

8.8 Identificación de la proliferación celular en ovarios adultos del murciélago *Artibeus jamaicensis*

La valoración de proliferación celular en ovarios adultos específicamente en las CGCA es de suma importancia. Esto se debe a que las células progenitoras de cualquier linaje celular presentan esta capacidad, lo que les permiten ser una fuente continúa de células regulando procesos importantes como la proliferación y la muerte celular para mantener un número estable de células.

Para la evaluación de la actividad proliferativa se realizaron ensayos para la detección por Inmunofluorescencia de tres marcadores reportados para proliferación celular: **Ki-67** (Ladstein *et al.*, 2010), **PCNA** (Foley *et al.*, 1993) y **pH3** (Hedzel *et al.*, 1997). Se utilizaron estos marcadores ya cada uno de ellos presenta puntos de expresión dentro del ciclo celular en diferentes momentos, coincidiendo en algunos puntos (Figura 13). Por lo tanto, esto nos aseguraría identificar proliferación celular independientemente de la fase del ciclo en la que esta se encuentre.

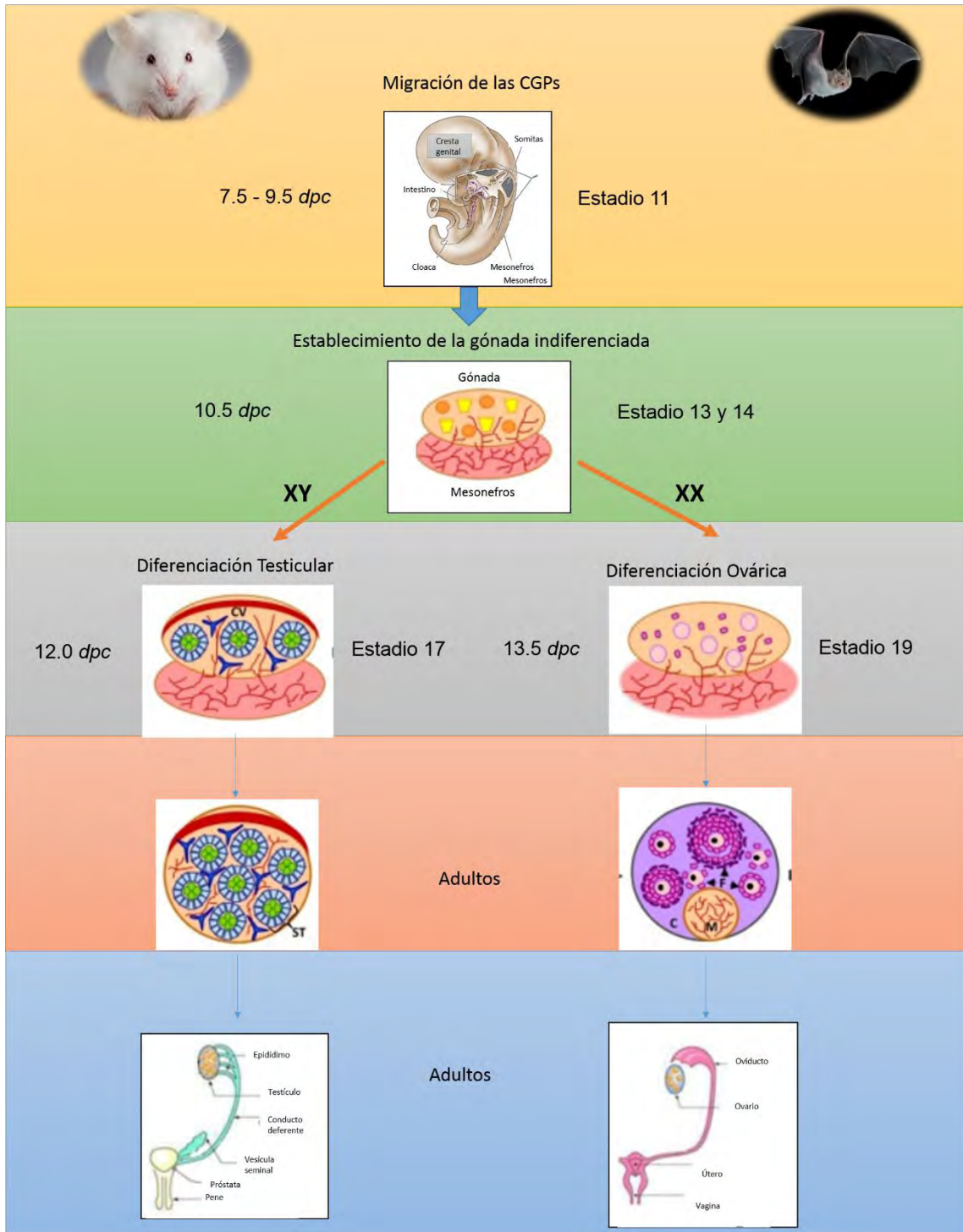


Figura 39. Correlación del desarrollo de la gónada en ratón y murciélago

El marcador de proliferación endógena más utilizado es el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA). Se ha reportado que la vida media del PCNA es de aproximadamente 20 h, y su expresión comienza a aumentar al final de la fase G1 y al inicio de la fase S disminuyendo a lo largo de la fase G2 y en la mitosis (Kurki *et al.*, 1886, Kurki *et al.*, 1988). Se ha descrito que el PCNA está presente en algunas células en proliferación incluso en G0, aunque su expresión es muy reducida (Bravo y Macdonald, 1987). En este estudio se utilizó el anticuerpo anti-PCNA (Anaspec 55421) el cual se ha manejado ampliamente en estudios de proliferación celular. Se ha reportado que la calidad del marcaje depende del método de fijación utilizado (Gwynn, 2001), por lo que se empleó paraformaldehído (PFA) al 4% para fijar los tejidos, ya que reportes anteriores han evidenciado que la fijación con PFA da como resultado células con marcaje intenso (Valero *et al.*, 2005). La expresión del PCNA se observó en su mayoría en las células de la granulosa; sin embargo, también se detectó en algunos ovocitos, lo cual no es factible ya que estos se encuentran en su mayoría arrestados en el diploteno de la profase I de la meiosis. Esto podría explicarse si asumimos que se sabe que PCNA participa en vías de reparación del ADN (Matsumoto *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1999), por lo que este marcaje inespecífico pudiera deberse a esta función de reparación. Pero debido a que se ha observado diferencias en el marcaje nuclear cuando las células son fijadas con metanol o formaldehído, se apuesta a que la expresión en ovocitos pudiera deberse a una señal inespecífica (Morris y Mathews, 1989; Scholzen y Gerdes 2000).

La expresión de la proteína Ki-67 refleja directamente un cierto estado fisiológico de la célula. Aunque se desconoce el papel funcional de la proteína Ki-67 durante la proliferación celular, es indudable que la expresión de la proteína Ki-67 y la proliferación celular están estrechamente relacionadas (Scholzen y Gerdes, 2000). Ki-67 es una proteína que sufre fosforilación y desfosforilación durante la mitosis y es susceptible a proteasas. Presenta un dominio FHA (forkhead associated domain), el cual está presente en todas las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (Hofmann y Bucher, 1995), por lo que se piensa que su expresión

es un requisito para la progresión del ciclo celular. Tiene un patrón de localización muy complejo y específico dentro del núcleo, que cambia durante el ciclo celular. Durante la interfase, el antígeno puede detectarse disperso dentro del núcleo, mientras que en la mitosis la mayor parte de la proteína se concentra en la superficie de los cromosomas (Endl y Gerdes, 2000). Se ha reportado que la contabilidad de figuras mitóticas utilizando Ki-67 es más sensible ya que reconoce a las células en todas las fases activas del ciclo celular (Scholzen y Gerdes, 2000).

Con base a estos argumentos, resultado de gran importancia el localizar la expresión de la proteína del gen Ki-67 en algunas células localizadas en la región cortical del ovario de *A. jamaicensis*. De esta manera, podemos sugerir que las CGCA se encuentran en proliferación mitótica, una de las características fundamentales de una célula progenitora.

Reproducimos los resultados antes obtenidos para **pH3** en el ovario de *Artibeus jamaicensis* (Antonio-Rubio *et al.*, 2013), corroboramos la expresión de pH3 en células corticales (posibles CGCA) de ambos ovarios. Estos resultados son importantes ya que se ha documentado que Histona 3 (H3) a diferencia de otras histonas, solo se fosforila durante la mitosis. La fosforilación de H3 se da en el residuo de Ser10, esto como parte del mecanismo de condensación cromosómica (Hedzel *et al.*, 1997). Esta fosforilación en Ser10 comienza en la profase, es máxima en la metafase, disminuye en la anafase y desaparece en telofase (Gurley *et al.*, 1978; Paulson y Taylor 1982). Por estas características, **pH3** es el mejor marcador para la validación de proliferación celular, ya que su expresión es exclusiva en mitosis.

8.9 Marcaje con BrdU

El método mas utilizado para determinar proliferación celular es la incorporación de **BrdU**, ya que el marcaje del ADN es *in vivo* dentro de las células y la analogía de la **BrdU** con la timidina da un mayor porcentaje de identificación (Gratzner *et*

al., 1982). La **BrdU** es un químico de uso fácil ya que se administra vía intraperitoneal en los animales, se incorpora en poco tiempo y es de fácil visualización mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-BrdU (*Muskhelishvili et al.*, 2003). La BrdU se incorpora fácilmente en los núcleos durante la fase de síntesis de ADN del ciclo celular (fase S). La visualización de BrdU en ovarios adultos de murciélago sugiere que estas células se encuentran en proliferación celular, estos resultados se obtienen en otros modelos de mamíferos que evidencian la presencia de células germinales proliferantes ubicadas en la región periférica del ovario (*Johnson et al.*, 2004).

BrdU se administra a animales vivos mediante inyecciones intraperitoneales. Las dosis de BrdU varían entre 25 y 600 µg/g de peso del animal (*Gratzner, 1982*). Se ha reportado que la exposición de altas dosis de BrdU afecta la morfología del cuerpo y el cerebro (*Kolb et al.*, 1999). Los protocolos recomiendan la administración de dosis bajas con varias aplicaciones múltiples de 50-500 µg/g (a menudo usadas con mamíferos adultos), sin embargo se ha observado que se pueden producir varios artefactos (*Valero et al.*, 2005). No obstante, la investigación específica requiere el uso de dosis más altas de BrdU (hasta 300 µg/g) para etiquetar a la mayoría de las células en división (*Gould y Gross, 2002*). En nuestro estudio, después de una inyección con BrdU y con un marcaje de 120 min se logró identificar una gran cantidad de células positivas a BrdU. Por nuestros controles positivos podemos asegurar que este marcaje fue específico, y podemos recomendar la aplicación de una única dosis de BrdU (100mg/Kg).

A la par se realizó la inmunodetección doble de **BrdU/Ki-67** y **BrdU/PCNA**, sin embargo no se logró visualizar la colocalización de estos marcadores en las CGCA, pero confirma que la marca obtenida de manera independiente de cada uno de estos marcadores es específica, ya que se identificó solo en células somáticas y nunca en ovocitos, hay que resaltar que algunas células de la granulosa colocalizan para ambos marcadores.

Los resultados obtenidos en animales marcados con **BrdU-PCNA** nos permitieron estudiar la relación entre las zonas de replicación del ADN en ovarios fijados. Con base en el grado de expresión encontrado en las células foliculares de los ovarios de ratón y de *A. jamaicensis*, podemos indicar que existe un mayor número de células positivas al **PCNA** con respecto a las marcadas con **BrdU**. No se observó una distribución homogénea, y muy pocas células co-localizan, es decir no todas las células **PCNA** positivas resultaron ser BrdU positivas. Estos hallazgos no apoyan resultados previos que muestran una distribución típica de la fase S de ambos marcadores ([Bravo y Macdonald, 1987](#); [Somanathan et al., 2001](#)), por lo que no podemos asegurar que el marcaje sea una replicación activa del **PCNA** durante la fase S del ciclo celular. Es decir, el **PCNA** no puede ser considerado un marcador específico de división celular mitótica, ya que debido a su función de reparación del ADN, puede estar expresándose en otros momentos de la vida de la célula y no solo durante procesos de mitosis.

Después del análisis experimental de los cuatro marcadores de proliferación celular: **BrdU**, **PCNA**, **Ki-67** y **pH3** podemos argumentar que cada uno presenta ventajas y desventajas sobre otro como marcador de proliferación mitótica. Las características generales que debe tener un marcador ideal de proliferación celular es que debe etiquetar exclusivamente a células en división, debe ser un marcador nuclear altamente específico y debe tener un marcaje en todas las fases activas del ciclo celular. Sin embargo, la proliferación celular es un proceso que cada célula individual toma y no se puede referir a un estado preciso, sino más bien a un evento futuro. Esta decisión es tomada por cada célula en la fase G1, por lo que el marcador debería ser positivo si la célula decide dividirse o bien negativo si la célula decide no hacerlo. Sin embargo, esto es solo una utopía ya que datos experimentales muestran que la decisión puede tomarse en fases posteriores del ciclo celular, postulando que las células pueden entrar en un estado inactivo incluso después de completar la síntesis de ADN ([Darzynkiewicz y Traganos, 1982](#); [Drewinko et al., 1984](#); [Lazebnik et al., 1991](#); [Wei et al., 1993](#)). Esto nos lleva

a la conclusión de que los marcadores de proliferación celular solo pueden utilizarse para indicar el potencial de proliferación que una célula pueda tener.

8.10 Doble inmunodetección de Ddx4/BrdU en CGCA

La incorporación de **BrdU** en algunas células, nos brinda herramientas para sugerir que estas células están se encuentran en división mitótica. Sin embargo, para probar que estas células en proliferación están relacionadas con un linaje germinal fue necesario realizar un doble inmunomarcaje con **Ddx4**, que como ya se menciona es un marcador característico de línea germinal. Se observaron algunas células localizadas en la corteza ovárica positivas a **BrdU** y **Ddx4**, lo que sugiere que las CGCA pudieran estar en división celular mantenido de esta forma un número estable de células germinales en el ovario adulto. Estos experimentos confirmaron la presencia de células doble positivas **Ddx4-BrdU** localizadas en la corteza ovárica. Nuestros resultados confirman lo que se ha observado en otros mamíferos ([Johnson et al., 2004](#); [Bukovsky et al., 2004](#)) sobre la existencia en el ovario de células progenitoras de la línea germinal. El inmunomarcaje de BrdU en células Ddx4-positivas fue comparable en intensidad a la observada en células somáticas tanto ováricas (foliculares) como intestinales (epiteliales) y debe subrayarse que en ninguno de los ovarios analizados se observó marca positiva para la BrdU en ovocitos adyacentes contenidos dentro de los folículos.

8.11 Disgregados-reagregados de ovario de ratón B6B5/EGFP y ovario de murciélago *Artibeus jamaicensis*

La disgregación-reagregación celular es un método que imita el ambiente *in vivo* de forma *in vitro*. Permite mantener los requerimientos celulares y moleculares de la organogénesis desarrollando cultivos organotípicos, esta estrategia experimental ha sido utilizada en diferentes órganos como: el riñón ([Moscona and Moscona, 1952](#)), piel ([Garber, 1976](#); [Moscona and Moscona, 1965](#)), timo ([Anderson et al., 1993](#)) y ganglios linfáticos ([White et al., 2007](#)). A pesar de ser

una metodología que simula *in vitro* el ambiente celular natural del órgano, no ha sido utilizada ampliamente argumentando que la reproductibilidad varía de experimento en experimento (Sheridan *et al.*, 2009). En órganos sexuales como los ovarios esta metodología no había sido utilizada por lo que se desconocía sus resultados en tan importantes órganos

Los disgregados celulares conformados por células de ovario de ratón y células de ovario de murciélago, se colocaron 96 h en cultivo de órganos para su reagregación. La viabilidad, integración, interacción celular y morfogénesis ovárica se evaluó por inmunofluorescencia detectando la expresión de marcadores de línea germinal (*Ddx4*, *Stella*), proliferación celular (*pH3*), uniones comunicantes (*CX43*) y componentes de láminas basales (*Laminina*).

El análisis por inmunofluorescencia de los DR muestra la presencia de dos poblaciones celulares, una que pertenece al ratón B6B5/EGFP (verde) y otra al murciélago filostómido (no verde). Los DR revelan que las células ováricas de ambas especies son capaces de interaccionar reconstituyendo estructuras similares a folículos ováricos, además hay que señalar que estos folículos son quiméricos debido a que están formados por un ovocito de ratón (verde) o de murciélago (no verde) rodeados de células somáticas de ambas especies. Estos hallazgos nos permiten asegurar que hubo una disgregación completa de ambos ovarios, lo que permitió que estos se mezclaran y se reagregaran durante el cultivo de órganos.

En nuestros experimentos a diferencia de otros reportes, observamos ovocitos de una u otra especie rodeados de células foliculares de ambos mamíferos. Eppig y Wigglesworth (2000) desarrollaron reagregados de ovarios de rata y ratón recién nacidos, los ovarios reagregados fueron injertados debajo de las cápsulas renales de ratones ovariectomizados. Observaron el desarrollo de ovarios quiméricos los cuales se desarrollaron con características morfológicas normales. Sin embargo una diferencia con respecto a nuestros resultados fue que los ovocitos de rata

crecieron dentro de folículos compuestos células somáticas de ratón y los ovocitos de ratón solo fueron rodeados por células foliculares de rata.

Conexina-43 (**CX43**) es una proteína que forma uniones comunicantes (Gap Junctions) entre las células de la granulosa en todas las etapas de la foliculogénesis (Valdimarsson *et al.*, 1993, Gittens *et al.*, 2003), estas uniones permiten el paso directo de pequeños iones y moléculas (Ca²⁺, AMPc, GMPc, IP3) conectando directamente el citoplasma de células adyacentes (Saez *et al.*, 2003). Ratones deficientes de **CX43** presentan folículos que detienen el desarrollo en estadios preantrales y los ovocitos no maduran (Ackert *et al.*, 2001). Gittens y Kidder (2005) evaluaron el papel de la **CX43** en ovarios quiméricos que contenían ovocitos mutantes y células de granulosa de tipo salvaje o la combinación inversa. Observaron que los ovarios compuestos de ovocitos deficientes en **CX43** con células de granulosa de tipo salvaje produjeron folículos antrales que se desarrollaron normalmente, sin embargo el desarrollo de los folículos como la maduración de los ovocitos se deterioró en ovarios que contenían ovocitos de tipo salvaje y células de granulosa deficientes en **CX43**, concluyendo que la ausencia de **CX43** en las células de la granulosa es suficiente para comprometer el desarrollo de los ovocitos y folículos. Con base a estos antecedentes aseguramos que las células de la granulosa en los DR de ovarios de ratón y murciélago interaccionan y se comunican por medio de uniones estrechas evidenciado por la expresión de **CX43**, lo que permitiría el desarrollo y continuación de la foliculogénesis *in vitro*.

Con la expresión de **Laminina** en los DR podemos asegurar que se restablecen las láminas basales delimitando a si compartimientos celulares. Observamos que ovocitos de murciélago fueron capaces de formar folículos en su mayoría secundarios al rodearse de células foliculares provenientes de ratón. De la misma manera, se encontraron folículos formados por ovocitos que acarrean PVF rodeados por células de la granulosa tanto de murciélago como de ratón.

Los DR de ovario de ratón y murciélago, indican que existe una comunicación estrecha entre las células germinales, mostrando que las células germinales cumplen un papel muy importante en la organización del ovario. Los ovocitos independientemente de la especie, fueron capaces de rodearse de células somáticas tanto de ratón como de murciélago llevando a la formación de folículos quiméricos, y evidenciando que el orquestador de la morfogénesis ovárica es el ovocito. Estas observaciones corroboran los resultados obtenidos por [Nicosia y Tojo \(1979\)](#) quienes disgregaron folículos antrales de ratón adulto y los reagregaron en cultivo estacionario. El resultado fue la formación de cordones epiteliales muy parecidos a folículos ováricos normales.

En ratón se examinó la reagregación de células germinales y somáticas observando que a los 13.5 *dpc* los ovocitos completan la profase I de meiosis pero no sobreviven después del trasplante. A los 15.5 *dpc* se desarrollan ovarios con un número reducido de ovocitos y a los 16.5 *dpc* se desarrollaron ovarios con folículos ([Nicholas et al., 2010](#)).

En disgregados reagregados heterotípicos de rata y ratón recién nacidos, se desarrollaron ovarios quiméricos donde los ovocitos de rata y ratón fueron capaces de interactuar con células somáticas de la otra especie, evidenciando que a pesar de haber divergido hace 11 millones de años, las células de rata y ratón pueden ser intercambiadas y producir ovocitos funcionales ([Eppig y Wigglesworth, 2000](#)).

8.13 Disgregados-reagregados de ovario de ratón y CGCA de murciélago

Cuando se reagregan CGCA de murciélago con células disociadas de ovario de ratón, observamos que algunas comienzan a rodearse de células foliculares tanto de ratón como de murciélago formando folículos primordiales, lo que sugiere que estas células entraron en un proceso de diferenciación estimulado por el ambiente ovárico. Se ha reportado que células progenitoras de la línea germinal se someten a diferenciación espontánea *in vitro* produciendo estructuras similares a ovocitos basado en criterios morfológicos, perfiles de expresión génica, activación meiótica

y la capacidad de atraer células de la granulosa para formar folículos (Novak *et al.*, 2006; Zhang *et al.* 2008; Pacchiarotti *et al.* 2010; White *et al.* 2012).

Con la finalidad de analizar el comportamiento de las CGCA reagregadas, se realizó un análisis del perfil de expresión de proteínas relacionadas con la línea germinal temprana en los DR de ovario de ratón y murciélago. La expresión ***Stella*** en células localizadas principalmente en la región cortical sin marca de PVF (Figura 37), sugiere que estas podrían estar relacionadas con células progenitoras. Esto correlaciona con el hecho de que se ha reportado que su expresión se activa durante el proceso de especificación de células germinales a los 7.25 *dpc*, a partir de entonces, se expresa en la línea germinal hasta los 15.5 *dpc* en gónadas masculinas y 13.5 *dpc* en gónadas femeninas. ***Stella*** no es detectable en los testículos adultos, pero si en ovarios localizada en ovocitos inmaduros y en embriones en preimplantación (Sato *et al.* 2002; Saitou *et al.* 2002).

Por otra parte se analizó la expresión de ***Ddx4***, el cual es un marcador característico de la línea germinal que se encuentra presente en el plasma germinal de invertebrados y en ovocito en desarrollo en vertebrados. En ratón, su expresión se ha mostrado restringida a las CGPs durante la embriogénesis y gametogénesis en ambos sexos (Castrillon *et al.*, 2000; Raz, 2000; Toyooka 2000). En nuestro estudio, se identificó la proteína del gen ***Ddx4*** en el citoplasma de las CGCA y en ovocitos de folículos en diferentes etapas (Figura 36). Finalmente podemos asegurar que esta estrategia metodológica permite estudiar las interacciones celulares cuando linajes celulares provenientes de diferentes especies de mamíferos son mezcladas. Los resultados revelan que los principales eventos de la morfogénesis ovárica como la foliculogénesis se llevan a cabo. La expresión de la proteína de los genes ***Ddx4***, ***Stella*** y ***pH3***, característicos de células pluripotentes en algunas células distribuidas aleatoriamente en los re-agregados, sugiere que la integridad de las CGCA se mantiene aún en un ambiente somático-ovárico no relacionado, lo que apunta a una autonomía de este tipo celular.

9. CONCLUSIONES



1. Nuestros resultados indican que el desarrollo gonadal temprano, la migración de las CGPs y la diferenciación testicular y ovárica en *Sturnira lilium* son similares a las descritas en otros mamíferos, principalmente en roedores.
2. La expresión de genes como **Sox9**, **Mis** y **Ddx4** se conservan en quirópteros y se sugiere que tienen una función similar a la descrita para otros mamíferos durante los procesos de determinación y diferenciación sexual gonadal.
3. El patrón de expresión de los marcadores de proliferación **pH3**, **Ki-67**, **PCNA** y **BrdU** se da en diferentes puntos del ciclo celular, por lo que la colocación de dos o más de estos marcadores permite identificar y validar células en proliferación.
4. Dentro de los marcadores de proliferación utilizados en este estudio, el más específico para evaluar proliferación celular fue **pH3** ya que su expresión se da exclusivamente en mitosis, seguido de la **BrdU** ya este nucleótido sintético es capaz de intercalarse en el ADN y ha sido validado en diferentes tejidos celulares. **Ki-67** tomaría el tercer lugar ya que relativamente es un nuevo marcador y aún sigue siendo validado, y al final estaría **PCNA** debido a que además de participar en la proliferación también actúa en vías de reparación de ADN, por lo que su marca podría no ser específica.
5. Las células provenientes de ovarios del murciélago *A. jamaicensis* y del ratón B6B5/EGFP, son capaces de interactuar entre sí y recapitular los eventos morfogénicos que llevan a la formación de un ovario.

6. Los linajes celulares de los ovarios de ratón y murciélago se reorganizan recapitulando los eventos de la foliculogénesis como son la formación de una membrana basal, la proliferación celular y la formación de uniones entre las células de la granulosa para envolver al ovocito y contribuir en su desarrollo.

7. La localización de marcadores como ***Ddx4*** y ***Stella*** en las CGCA aisladas y reagregadas con células ováricas de ratón, nos indica que estos genes están activos, lo que sugiere que las CGCA están relacionadas con un linaje germinal temprano y que un posible mecanismo de neo-ovogénesis se esté llevando a cabo en los ovarios

10. REFERENCIAS



1. Abban G, Johnson J. (2009). Stem cell support of oogenesis in the human. *Hum Reprod.* 24(12):2974-8.
2. Ackert C. L, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. (2001). Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 233, 258-270.
3. Acosta Lobo ME, Vásquez Araque NA, Londoño Franco LF. (2013). Inactivación del cromosoma X en el desarrollo embrionario mamífero. *Ces. Med. Vet. Zootec.* vol.8 no.2.
4. Adams IR, McLaren A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development.* 129(5):1155-1164.
5. Anderson G, Jenkinson EJ, Moore NC, Owen JJ. (1993). MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* 362(6415):70-73.
6. Anderson A, Copeland TK, Choler H., Heasman J, Eylie, C. (2001). The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev.* 91(1-2):61-68.
7. Antonio-Rubio NR, Porrás-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. (2013). Identification of cortical germ cells in adult ovaries from three phyllostomid bats: *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*. *Reprod Fertil Dev.* 25(5):825-36.
8. Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T, Matsui Y, Nagasawa T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci.* 100(9):5319-23.
9. Auguste A, Chassot A-A, Gre'goire EP, Renault L, Pannetier M, Treier M, Pailhoux E, Chaboissier M-C. (2011). Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. *Sex Dev.* 5(6):304-317.
10. Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet.* 38(12):1430-1434.
11. Barnard S. (2005). *Bats captivity Mel-buorne*. Fl: Kriegers Publishing Company.
12. Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C. Scherer G. (2006). Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod.* 74(1):195-201.

13. Behringer R, Gertsenstein M, Vintersten K, Nagy A. (2013). Isolation, culture and manipulation of postimplantation embryos. In: *Manipulating the mouse embryo*. Behringer R et al., eds. Vol. 5 pp. 149-156.
14. Bendel-Stenzel MR, Gomperts M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. (2000). The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech Dev*. 91:143–152.
15. Bernard P, Sim H, Knowler K, Vilain E, Harley V. (2008). Human SRY inhibits β -catenin-mediated transcription. *Int J Biochem Cell Biol*. 40(12):2889–2900.
16. Bowles J, Koopman P. (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development*. 134(19):3401-3411.
17. Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, Van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*. 139(7):1243-1254.
18. Bravo R, Macdonald B. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J. Cell Biol*. 105(4):1549 – 1554.
19. Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Mayo KE, Shea LD, Woodruff TK. (2006). Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol*. 298(1):149-154.
20. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. (2009). Ovarian aging: mechanism and clinical consequences. *Endocr Rev*. 30(5):465-493.
21. Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S. (1993). Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. *Dev Dyn*. 198(3):182-189.
22. Buehr M, Subin GU, McLaren A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*. 117(1):273-281.
23. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*. 2:20.
24. Bullejos M, Koopman P. (2001). Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn*. 221(2):201-205.
25. Burgoyne PS. (1998). The mammalian Y chromosome: a new perspective. *BioEssays* 20 363–366.
26. Byskov AG, Høyer PE, Yding Andersen C, Kristensen SG, Jespersen A, Møllgård K. (2011). No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. *Hum. Reprod*. 26(8):2129-2139.

27. Campos-Sánchez R, Kapusta A, Feschotte C, Chiaromonte F, Makova KD. (2014). Genomic landscape of human, bat and ex vivo DNA transposon integrations. *Mol Biol Evol.* 31(7):1816–1832.
28. Capel B. (2017). Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nat Rev Genet.* doi: 10.1038/ngr.2017.60.
29. Carré GA, Greenfield A. (2016). The gonadal supporting cell Lineage and mammalian sex determination: The Differentiation of Sertoli and granulosa cells. *Results Probl Cell Differ.* 58:47-66.
30. Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. (2000). The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(17):9585-9590.
31. Chang H, Matzuk MM. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev.* 104(1-2):61-7.
32. Chiquoine AD. (1954). The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *The anatomical Record.* 118;135-146.
33. Chuaire L. Sánchez C. (2002). Células germinativas primordiales femeninas: origen y migración hacia los primordios gonadales. *Colombia Médica.* 33:004 171-178.
34. Cinquin O, Crittenden SL, Morgan DE, Kimble J. (2010). Progression from a stem cell-like state to early differentiation in the *C. elegans* germ line. *Proc Natl Acad Sci.* 107(5):2048- 2053.
35. Cocquet J, Baere ED, Gareil M, Pannetier M, Xia X, Fellous M, Veitia RA. (2003). Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. *Cytogenet Genome Res.* 101(3- 4):206-211.
36. Cohen AA. (2004). Female post-reproductive lifespan: a general mammalian trait. *Biol Rev.* 79:733-750.
37. Cretekos CJ, Weatherbee SD, Chen CH, Badwaik NK, Niswander L, Behringer RR, Rasweiler JJ 4th. (2005). Embryonic staging system for the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata*, a model organism for the mammalian order Chiroptera, based upon timed pregnancies in captive-bred animals. *Dev Dyn.* 233(3):721-738.
38. Cretekos CJ, Wang Y, Green ED, Martin JF, Rasweiler IV JJ, Behringer RR. (2008). Regulatory divergence modifies limb length between mammals. *Genes Dev.* 22(2):141–151.
39. Crews D. 1994. Temperature, steroids, and sex determination. *J. Endocrinol.* 142 (1), 1-8.

40. Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, Ellenberg J, Hyman AA, Gerlich DW. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*. 535(7611):308-312.
41. De Felici M. (2016). The Formation and Migration of Primordial Germ Cells in Mouse and Man. *Results Probl Cell Differ*. 58:23-46
42. DeFalco T, Takahashi S, Capel B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev Biol*. 352(1):14-26.
43. DeFalco T. Capel, B. (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 25:457-482.
44. Delbridge ML, Graves JA. (1999) Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes. *Rev Reprod*. 4(2):101-109.
45. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development*. 127 (19):4277-4291.
46. Durcova-Hills G, Tang F, Doody G, Tooze R, Surani MA. (2008). Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 3(10):e3531.
47. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 30(6):624-712.
48. Edson MA, Nalam RL, Clementi C, Franco HL, Demayo FJ, Lyons KM, Pangas SA, Matzuk MM. (2010). Granulosa cell-expressed BMPR1A and BMPR1B have unique functions in regulating fertility but act redundantly to suppress ovarian tumor development. *Mol Endocrinol* 24(6):1251-1266.
49. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. (2006). Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 441(7097):1109-1114.
50. Eggers S, Ohnesorg T, Sinclair A. (2014). Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat Rev Endocrinol*. 10(11):673-683.
51. Eicher EM, Shown EP, Washburn LL. (1995). Sex reversal in C57BL/6J-YPOS mice corrected by a Sry transgene. *Philos. Trans. R. Soc. Ser. B* 350: 263– 269.
52. Emmons, L. (1997). *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide*. Chicago: University of Chicago Press.
53. Endl E, Gerdes J. (2000). The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp. Cell Res*. 257(2):231-7.
54. Eppig JJ, Wigglesworth K. (2000). Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggregated ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. *Biol Reprod*. 63(4):1014-1023.

55. Everitt AR, Clare S, Pertel T, John SP, Wash RS, Smith SE, Chin CR, Feeley EM, Sims JS, Adams DJ, Wise HM, Kane L, Goulding D, Digard P, Anttila V, Baillie JK, Walsh TS, Hume DA, Palotie A, Xue Y, Colonna V, Tyler-Smith C, Dunning J, Gordon SB, Smyth RL, Openshaw PJ, Dougan G, Brass AL, Kellam P. (2012). IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature*. 484(7395):519-523.
56. Ewen KA, Koopman P. (2010) Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol*. 323(1):76-93.
57. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. (1998). Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(12):6965-6970.
58. Fleming NI, Knowler KC, Lazarus KA, Fuller PJ, Simpson ER, Clyne CD. (2010). Aromatase is a direct target of FOXL2: C134W in granulosa cell tumors via a single highly conserved binding site in the ovarian specific promoter. *PLoS ONE*. 5(12):e14389.
59. Fleming TH, Hooper ET, Wilson DE. (1972). Three Central American communities: structure, reproductive cycles and movements patterns. *Ecology*. Vol. 53, No. 4. pp. 556-569.
60. Fleming, T. (2003). *A Bat Man in the Tropics: Los Chasing El Duende*. Los Angeles, CA. University of California Press.
61. Foley JF, Dietrich DR, Swenberg JA, Maronpot RR. (1993). Detection and duration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in rat tissue by an improved immunohistochemical procedure. *J Histotech* 14:237.
62. Gannon M, Willing M, Jones J Jr. (1989). *Sturnira lilium*. *The American society of mammalogist* 333: 1-5.
63. Garber BB. (1976). Control of epithelial development. *Curr Probl Dermatol*. 6:154-190.
64. Georges A, Benayoun BA, Marongiu M, Dipietromaria A, L'Hoˆte D, Todeschini A-L, Auer J, Crisponi L, Veitia RA. (2013). SUMOylation of the forkhead transcription factor FOXL2 promotes its stabilization/ activation through transient recruitment to PML bodies. *PLoS One*. 6(10):e25463.
65. Gheorghisan-Galateanu AA, Hinescu ME, Enciu AM. (2014). Ovarian adult stem cells: hope or pitfall? *Journal of Ovarian Research*. 7(71).
66. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 110(2):521-528.
67. Gittens J. E., Mhawi A. A., Lidington D., Ouellette Y. and Kidder G. M. (2003). Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 284, C880-C887.

68. Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C, Heasman J. (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*. 120 :(1)135–141.
69. Gosden R, Telfer E, Faddy M. (2009). Germ line stem cells and adult ovarian function. In *Stem Cells and Human Reproduction*. Edited by: Simon C, Pellicer A. London: Informa Healthcare 58-69.
70. Gosden RG. (2013). Oocyte development and loss. *Semin Reprod Med*. 31(6):393-398.
71. Gougeon A. (2005). Neo-oogenesis in the postnatal ovary: fantasy or reality? *Gynecol Obstet Fertil*. 33(10):819-823.
72. Gougeon A. (2010). Is neo-oogenesis in the adult ovary, a realistic paradigm? *Gynecol Obstet Fertil*. 38(6):398-401.
73. Gould E, Gross CG. (2002). Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci*. 22(3):619-623.
74. Gratzner HG. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 218, 474-476.
75. Graves JA. (1995). The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 350(1333):305-311.
76. Griswold SL, Behringer RR. (2009). Fetal leydig cell origin and development. *Sex Dev*. 3(1):1-15.
77. Grzimek B. (1990). Bats pp. 584-611 in Grzimek, B., ed. *Grzimek's encyclopedia of mammals*, Vol. 1, 2 Edition New York, NY. McGraw-Hill Publishing Co.
78. Gubbay J, Lovell-Badge R. (1994). The mouse Y chromosome. In *Molecular Genetics of Sex Determination*, ed. S Wachtel, pp. 43– 67. London: Academic.
79. Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1992). Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7953– 7957.
80. Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA. (1978). Histone Phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem*. 84(1).1.15.
81. Gwynn IA. (2001). Preservation of tissue for immunocytochemical studies. In: Beesley JE. (Ed.), *Immunocytochemistry and In Situ Hybridization in the Biomedical Sciences*. Birkhäuser, Berlin, 2001, pp. 6 – 29.

- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. (1991). Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(21):9618-9622.
82. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121(6):1603-1614.
83. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*. 121(6):1603-1614.
84. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A. (2001). Two Splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*. 106(3):319-329.
85. Hatano O, Takayama K, Imai T, Waterman MR, Takakusu A, Omura T, Morohashi K. (1994). Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development*. 120(10):2787-2797.
86. Hayes TB. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibian: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool*. 281(5):373-399.
87. Hemdzal MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spread in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106(6):348-360.
88. Hiramatsu R, Harikae K, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Matsuo I, Kanai Y. (2010). FGF signaling directs a center-to-pole expansion of tubulogenesis in mouse testis differentiation. *Development*. 137(2):303-312.
89. Hofmann K, Bucher P. (1995). The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci*. 20(9):347-9.
90. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol*. 8(5):654-662.
91. Janzen FJ, Paukstis G. (1991). Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. *Q Rev Biol*. 66(2):149-179.
92. Jeske YW, Bowles J, Greenfield A, Koopman P. (1995). Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet*. 10(4):480-482.
93. Jimenez R, Sanchez A, Burgos M, De La Guardia RD. (1996). Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet*. 12(5):164-166.
94. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428(6979):145-150.

95. Jones JK, Phillips CJ. (1966). Bats of genus *Sturnira* in the lesser Antilles. Occas Paper Mus. Texas Tech Univ. 40:1-16.
96. Josso N, Racine C, di Clemente N, Rev R, Xavier F. (1998). The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol.* 145(1-2):3-7.
97. Karl J, Capel B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* 203(2):323-333.
98. Kashimada K, Koopman P. (2010). Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development.* 137(23):3921-3930.
99. Kashimada K, Pelosi E, Chen H, Schlessinger D, Wilhelm D, Koopman P. (2011). FOXL2 and BMP2 act cooperatively to regulate follistatin gene expression during ovarian development. *Endocrinology.* 152(1):272-280.
100. Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, Nagel R, Voorhoeve PM, van Duijse J, Ørom UA, Lund AH, Perrakis A, Raz E, Agami R. (2007). RNA-binding protein DND1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell.* 131(7):1273-1286.
101. Kill IR. (1996). Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci.* 109 (Pt 6):1253-1263.
102. Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 4(6):e187.
103. Kimble J. (2011). Molecular regulation of the mitosis/meiosis decision in multicellular organisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a002683.
104. Kolb B, Perderson B, Ballermann M, Gibb R, Whishaw IQ. (1999). Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities. *J Neurosci.* 19(6):2337-46.
105. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117–121.
106. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(8):2474-2479.
107. Kunz, T., P. August, C. Burnett. (1983). Harem Social Organization in Cave Roosting *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Biotropica*, 15(2): 133-138.

108. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. (2008). Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev.* 22(12):1617-1635.
109. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res.* 166(1):209-19.
110. Kurki P, Ogata K, Tan EM. (1988). Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 109(1):49-59
111. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. (2010). Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer.* 10:140.
112. Lange UC, Adams DJ, Lee C, Barton S, Schneider R, Bradley A, Surani MA. (2008). Normal germ line establishment in mice carrying a deletion of the *Irfm/Fragilis* gene family cluster. *Mol Cell Biol.* 28(15):4688-4696.
113. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. (1999). BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13(4):424-436.
114. Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL. (2007). Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol.* 25(22):3198-3204.
115. Leitch HG, Tang WW, Surani MA. (2013). Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 104:147-187
116. Lin H, Gupta V, Vermilyea MD, Falciani F, Lee JT, O'Neill LP, Turner BM. (2007). Dosage compensation in the mouse balances up-regulation and silencing of X-linked genes. *PLoS Biol.* 5(12):e326.
117. Lovell-Badge R, Robertson E. (1990). XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine primary testis determining gene, TDY. *Development* 109: 635– 646.
118. Lovell-Badge R. (1992). The role of Sry in mammalian sex determination. In *Postimplantation Development in the Mouse*. Ciba Found. Symp. 165: 162– 182.
119. Lui P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. (1999). Requirement for *Wnt3* in vertebrate axis formation. *Nat Genet.* 22(4):361-365.
120. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 77(4):481-490.

121. Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. (2008). Stabilization of B-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet.* 17(19):2949- 2955.
122. MacCallum DE, Hall PA. (2000). The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol* 191(3):286-298.
123. MacLean G, Li H, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. (2007). Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology.* 148(10):4560-4567.
124. Mahakali Zam A, Hudson FP 3rd, Bedell MA. (2005). Analysis of hypomorphic KitlSl mutants suggests different requirements for KITL in proliferation and migration of mouse primordial germ cells. *Biol Reprod.* 73(4):639-647.
125. Marlow F. (2015). Primordial Germ Cell Specification and Migration. *F100Res.* 16;4.
126. Marques-Aguiar, S. (2007). Genus *Artibeus*. pp. 301-321 in A Gardner, ed. *Mammals of South America, Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats.* Chicago: The University of Chicago Press.
127. 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):637-642.
128. McClelland K, Bowles J, Koopman P. (2012). Male sex determination: insights into molecular mechanisms. *Asian J Androl.* 14(1):164-171.
129. McCoshen JA, McCallion DJ. (1975). A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice. *Experientia.* 31(5):589-590.
130. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(8):3368-3372.
131. McLaren A, Lawson KA. (2005). How is the mouse germ-cell lineage established?. *Differentiation.* 73(9-10):435-437.
132. McLaren A, Southee D. (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol.* 187(1):107-113.
133. McLaren A. (2000). Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol.* 163(1-2):3-9.
134. McLaren A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol.* 262(1):1-15.
135. Medellín RA, Arita HT, Sanchez O. (2008). Morfología externa de un murciélago. *Phyllostomidae.* In: *Identificación de los Murciélagos de México. Clave de Campo* 2nd ed, pp. 32–50. Ciudad de México, Instituto de Ecología, UNAM.

136. Mello MAR, Kalko EKV, Silva WR. (2008). Diet and Abundance of the Bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian Montane Atlantic Forest. *J Mammal* 89: 485-492.
137. Menke DB, Koubova J, Page DC. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol.* 262(2):303-312.
138. Merchant H. (1975). Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol.* 44(1):1-21.
139. Merchant-Larios H. Taketo T. (1991). Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Elec Micro Tech.* 19(2):158-171.
140. Merchant-Larios H. Moreno-Mendoza N. Buehr M. (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol.* 37(3):407-415.
141. Merritt, J. (2010). *The Biology of Small Mammals*. Baltimore: John Hopkins University Press.
142. Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. (2009). Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 15(5):573- 585.
143. Miller B, Reid F, Arroyo-Cabrales J, Cuarón AD. Grammont PC. (2016). *Artibeus jamaicensis*. The IUCN Red List of Threatened Species e.T88109731A21995883.
144. Molyneaux K A, Stallock J, Schaible K, Wylie C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol.* 240(2):488-498.
145. Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development.* 130(18):4279-4286.
146. Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, Marzi L, Cohen-Solal A, Georg I, Klattig J, Englert C, Kim Y, Capel B, Eguchi N, Urade Y, Boizet-Bonhoure B, Poulat F. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development.* 136 (11):1813-1821.
147. Moreno-Mendoza N, Harley V, Merchant-Larios H. (2003). Cell aggregations precedes the onset of sox9-expressing preSertoli cells in the genital ridge of the mouse. *Cytogenet Genome Res.* 101(3-4):219-223.
148. Morris GF, Mathews MB. (1989) Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 264:13856–13864.
149. Morrish BC, Sinclair AH. (2002). Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction.* 124(4):447-457.

150. Moscona A, Moscona H. (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J Anat.* 86(3):287–301.
151. Moscona H, Moscona A. (1965). Control of differentiation in aggregates of embryonic skin cells: Suppression of feather morphogenesis by cells from other tissues. *Dev Biol.* 11(3):402–423.
152. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. (2003). Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem.* 51(12):1681-1688.
153. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, Tanaka S, Shiota K, Nakano T. (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol.* 9(1):64-71.
154. Nam JS, Turcotte TJ, Smith PF, Choi S, Yoon JK. (2006). Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J Biol Chem.* 281(19):13247-13257.
155. Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P, Parker KL, Vassalli JD. (2005). Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol.* 287(2):361-377.
156. Nicosia SV, Tojo R. (1979). Morphogenetic reaggregation and luteinization of mouse preantral follicle cells. *Am J Anat.* 156(3):401-427.
157. Nicholas (2009). Transplation directs oocyte-maturation from embryonic stem cells and provides a therapeutic strategy for female infertility. *Human Mol Genet.*
158. Nie K, Gomez M, Landgraf P, Garcia JF, Liu Y, Tan LH, Chadburn A, Tuschl T, Knowles DM, Tam W. (2008). MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol.* 173(1):242-252.
159. Nordqvist K, Lovell-Badge R. (1994). Setbacks on the road to sexual fulfillment. *Nat. Genet.* 7(1):7-9.
160. Novak I, Lightfoot DA, Wang H, Eriksson A, Mahdy E, Höög C. (2006). Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells.* 24(8):1931-1936.
161. Nowak RM. (1999). Walker's mammals of the World, 6th Edition. Vol. 1. John Hopkins University Press, Baltimore, USA.
162. Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. (2009). Signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell.* 137(3):571-584.

163. Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovskiy A, Saitou M, Surani MA. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*. 436(7048):207-213.
164. Oi A, Tasaki H, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. (2015). Effects of reaggregated granulosa cells and oocytes derived from early antral follicles on the properties of oocytes grown in vitro. *J Reprod Dev*. 61(3):191-197.
165. Ortega, J., H. Arita. (1999). Structure and social dynamics of harem groups in *Artibeus Jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Journal of Mammalogy*, 80(4): 1173-1185.
166. Ottolenghi C, Uda M, Crisponi L, Omari S, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D. (2006) Determination and stability of sex. *Bioessays*. 29(1):15-25.
167. Pacchiarotti J, Maki C, Ramos T, Marh J, Howerton K, Wong J, Pham J, Anorve S, Chow Y-C, Izadyar F. (2010). Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation*. 79:159-170.
168. Painter TS. (1923). Studies in mammalian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man. *J Exp Zool* 37: 291–338.
169. Palmer SJ, Burgoyne PS. (1991). The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex-reversal in C57BL/6-YPOS mice. *Development*. 113(2):709-714.
170. Park SY, Jameson L. (2005). Minireview. Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology*. 146(3):1035-1042.
171. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet*. 38(11):1304-1309.
172. Paulson JR, Taylor SS. (1982). Phosphorylation of histones 1 and 3 nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa Metaphase chromosomes. *J Biol Chem*. 257(11):6064-6072.
173. Payer B, Saitou M, Barton SC, Thresher R, Dixon JP, Zahn D, Colledge WH, Carlton MB, Nakano T, Surani MA. (2003). Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr Biol*. 13(23):2110-2117.
174. Pelliniemi LJ, Frojman K. (2001). Structural and regulatory macromolecules in sex differentiation of gonads. *Journal of experimental zoology*. 290(5):523-528.
175. Pelliniemi LJ. (1975). Ultrastructure of gonadal ridge in male and female pig embryos. *Anat Embryol (Berl)*. 147(1):20-34.
176. Polaco JC, Koopman P. (2007). Sry and the hesitant beginnings of male development. *Dev Biol* 302(1):13-24.

177. Porras-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. (2017). Neo-ogenesis in mammals. *Zygote*. 25(4):404-422.
178. Rasweiler JJ 4th. (1993). Pregnancy in chiroptera. *J Exp Zool*. 266: 495-513.
179. Rasweiler JJ 4th, Badwaik NK. (2000). Anatomy and physiology of the female tract. In 'Reproductive Biology of Bats'. (Eds EG. Crichton and PH. Kruttsch.) pp. 157–219. (Academic Press: London).
180. Raz E. (2000). The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol*. 1(3):REVIEWS1017.
181. Richardson BE, Lehmann R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(1):37-49.
182. Roos AJ, Capel B. (2005) Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab*. 16(1):19-25.
183. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev*. 83: 1359–1400.
184. Saffman EE, Lasko P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrate. *Cell Mol Life Sci*. 55(8-9):1141-1163.
185. Saga Y. (2008) Mouse germ cell development during embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 18 (4):337-341.
186. Saitou M, Barton SC, Surani MA. (2002). A molecular programme for the specificataion of germ cell fate in mice. *Nature*. 418(6895):293-300.
187. Saitou M, Yamaji M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4(11).
188. Sasaki H, Matsu Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyod. *Nat Rev Genet*. 9(2):129-140
189. Sato M, Kimura T, Kurokawa K, Fujita Y, Abe K, Masuhara M, Yasunaga T, Ryo A, Yamamoto M, Nakano, T. (2002). Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech Dev*. 113(1):91-94.
190. Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*. 27(1):65-73.
191. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier A-C, Treier M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*. 131(4):933-942.
192. Scholzen T, Gerdes J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311–322.

193. Sekido R, Lovell-Badge R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*. 453(7197):930-934.
194. She ZY, Yang WX. (2014). Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *J Mol Endocrinol*. 53(1):R21-37.
195. Sheridan M, Taoudi S, Medvinsky A, Blackburn CC. (2009). A novel method for the generation of reaggregated organotypic cultures that permits juxtaposition of defined cell populations, *Genesis*. 47(5):346-351.
196. Silverman AJ. (2004). Gonadal development. Larsen, *Human Embryology*, 3rd Edition, pp276-293.
197. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346(6281):240-244.
198. Smith CA, Sinclair AH. (2004), Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*. 26(2):120-132.
199. Somanathan S, Suchyna TM, Siegel AJ, Berezney R. (2001). Targeting of PCNA to sites of DNA replication in the mammalian cell nucleus. *J Cell Biochem*. 81(1):56-67.
200. Spradling A, Fuller MT, Braun RE, Yoshida S. (2011). Germline stem cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(11): a002642.
201. Stoner, K. (2001). Differential habitat use and reproductive patterns of frugivorous bats in tropical dry forest of northwestern Costa Rica. *Canadian Journal of Zoology*, Vol. 79 Issue 9: p1626.
202. Svingen T, Koopman P. (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev*. 27(22):2409-2426.
203. Taddei VA. (1976). The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera), from the northwestern region of the state of Sao Paulo, *Bolm. Zool., Univ. S. Paulo* 1:313-330.
204. Takeuchi Y, Molyneaux K, Runyan C, Schaible K, Wylie C. (2005). The roles of FGF signaling in germ cell migration in the mouse. *Development*. 132(24):5399-53409.
205. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokayama M, Noce T. (2000). The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev*. 14(7):841-853.
206. Tanaka SS, Matsui Y. (2002). Developmentally regulated expression of mil-1 and mil-2, mouse interferon-induced transmembrane protein like genes, during

- formation and differentiation of primordial germ cells. *Mech Dev.* 119 Suppl 1:S261-S267.
207. Tilly JL, Johnson J. (2007). Recent arguments against germ cell renewal in the adult human ovary: is an absence of marker gene expression really acceptable evidence of an absence of oogenesis? *Cell Cycle.* 6(8):879-883.
 208. Toyooka Y., Tsunekawa N., Takahashi Y., Matsui Y., Satoh, M. and Noce T. (2000). Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech. Dev.* 93, 139–149.
 209. Tremblay KD, Dunn NR, Robertson EJ. (2001). Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development.* 128(18):3609-3621.
 210. Turner JMA. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development.* 134: 1823-1831.
 211. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13(11):1171–1181.
 212. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier A-C, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schütz G, Cooney AJ, Lovell-Badge R, Treier M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 139(6):1130-1142.
 213. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 397(6718):405-409.
 214. Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Alonso JR. (2005). Proliferation markers in the adult rodent brain: Bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res Brain Res Protoc.* 15(3):127-34.
 215. Valdimarsson G, De Sousa PA, Kidder GM. (1993). Coexpression of gap junction proteins in the cumulus-oocyte complex. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 7-15.
 216. Vallender EJ, Lahn BT. (2006). Multiple independent origins of sex chromosomes in amniotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(48):18031-18032.
 217. Vaughn, T., J. Ryan, N. Czaplewski. (2011). *Mammalogy* 5th. Edition. Sudbury, Massachusetts: Jones & Bartlett Publishers.
 218. Velazco, P. Patterson, B. (2017). *Sturnira lilium*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T88159688A22049384.
 219. Verdin H, De Baere E. (2012). FOXL2 impairment in human disease. *Horm Res Pediatr.* 77(1):2-11.

220. Vieira, M., R. Carvalho-Okano. (1994). Pollination biology of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) in southeastern Brazil. *Biotropica*, Vol. 1 Issue 1: p73-80.
212. Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, Bikoff EK, Robertson EJ. (2005). The zinc finger transcriptional repressor *Blimp1/Prdm1* is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development*. 132(6):1315-1325.
222. Weber S, Eckert D, Nettersheim D, Gillis AJ, Schäfer S, Kuckenberger P, Ehlermann J, Werling U, Biermann K, Looijenga LH, Schorle H. (2010). Critical function of *AP-2 gamma/TCFAP2C* in mouse embryonic germ cell maintenance. *Biol Reprod*. 82(1):214-223.
223. Wessel OM. (2016). Germ line mechanics-and unfinished business. *Curr Top Dev Biol*. 117:553-566.
224. Western PS, Miles DC, van den Bergen JA, Burton M, Sinclair AH. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells*. 26(2):339-347.
225. White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. (2012). Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med*. 18(3):413-421.
226. Wilhelm D, Martinson F, Bradford S, Wilson MJ, Combes AN, Beverdam A, Bowles J, Mizusaki H, Koopman P. (2005). Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol*. 287(1):111-124.
227. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. (2007). Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol Rev*. 87(1):1-28.
228. Wilson DE. (1979). Reproductive patterns. Pp. 317–378 in *Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae*. Part III (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Cartereds.). Special Publication 16. The Museum, Texas Tech University.
229. Wimsatt WA. (1975). Some comparative aspects of implantation. *Biol Reprod*. 12(1):1-40.
230. Wimsatt WA. (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *J Reprod Fertil*. 56(1):345-357.
231. Witschi, E. (1948). Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contributions to Embryology*, 32, 67–80.
232. Wu X, Wan S, Lee MM. (2007). Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol*. 213(2):429-433.

233. Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M. (2006). Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod.* 75(5):705-716.
234. Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. (2005). Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns.* 5(5):639-646.
235. Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, Yamanaka K, Ohinata Y, Saitou M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet.* 40(8):1016-1022.
236. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 16(11):1433-1440.
237. Yao HHC, Matzuk MM, Jorgez CJ, Menke DB, Page DC, Swain A, Capel B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn.* 230(2):210-215.
238. Zhang D, Fouad H, Zoma WD, Salama SA, Wentz MJ, Al-Hendy A. (2008). Expression of stem and germ cell markers within nonfollicle structures in adult mouse ovary. *Reprod. Sci.* 15, 139–146.
239. Zhang G, Gibbs E, Kelman Z, O'Donnell M, Hurwitz J. (1999). Studies on the interactions between human replication factors C human proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(5):1869-1874.
240. Zuckerman S. (1951). The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res.* 6:63-108.

11. PUBLICACIONES



11.1 **Porras-Gómez Tania Janeth** and Moreno-Mendoza Norma. Neo-oogenesis in mammals. *Zygote* 25 (August), pp. 404-422, 2017.

11.2 **Porras-Gómez Tania Janeth**, Martínez-Juárez Adriana y Moreno-Mendoza Norma. Gonadal morphogenesis and establishment of the germline in the phyllostomid bat *Sturnira lilium*. *Acta Histochemica* 119: 671-679, 2017.

11.3 Martínez-Juárez A. López-Luna M. **Porras-Gómez T.** y Moreno-Mendoza N., (2018). Expression of the Sox9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2018 Mar 30. doi: 10.1002/jez.b.22799. [Epub ahead of print]

Neo-oogenesis in mammals

Tania Janeth Porras-Gómez² and Norma Moreno-Mendoza¹

Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México

Date submitted: 10.11.2016. Date revised: 16.05.2017. Date accepted: 25.05.2017

Summary

Recently, the existence of a mechanism for neo-oogenesis in the ovaries of adult mammals has generated much controversy within reproductive biology. This mechanism, which proposes that the ovary has cells capable of renewing the follicular reserve, has been described for various species of mammals. The first evidence was found in prosimians and humans. However, these findings were not considered relevant because the predominant dogma for reproductive biology at the time was that of Zuckerman. This dogma states that female mammals are born with finite numbers of oocytes that decline throughout postnatal life. Currently, the concept of neo-oogenesis has gained momentum due to the discovery of cells with mitotic activity in adult ovaries of various mammalian species (mice, humans, rhesus monkeys, domestic animals such as pigs, and wild animals such as bats). Despite these reports, the concept of neo-oogenesis has not been widely accepted by the scientific community, generating much criticism and speculation about its accuracy because it has been impossible to reproduce some evidence. This controversy has led to the creation of two positions: one in favour of neo-oogenesis and the other against it. Various animal models have been used in support of both camps, including both classic laboratory animals and domestic and wild animals. The aim of this review is to critically present the current literature on the subject and to evaluate the arguments pro and contra neo-oogenesis in mammals.

Keywords: Germ line stem cells, Mammalian ovary, Neo-oogenesis, Ovarian stem cells, Primordial germ cells

Introduction

The ovaries are the female sex glands that produce hormones responsible for ensuring the proper functioning of all sexual organs in females. During their development, the ovaries fulfill two fundamental processes: (1) oogenesis, in which female germ cells (oocytes) are formed and mature; and (2) folliculogenesis, in which somatic cells (granulosa and theca) surround the oocyte and form ovarian

follicles. Because of cellular interactions that take place between the oocyte and somatic cells and hormonal influences, the ovary becomes endowed with a finite number of germ cells at birth that diminishes with age, once the reproductive stage begins, and eventually disappears (Zuckerman, 1951). In contrast, several studies have suggested that the adult mammalian ovary is not provided with a finite number of oocytes, as has been asserted for so long. Classic and current evidence indicates that the adult mammalian ovary possesses self-renewing germline stem cells (GSCs) that form a reserve of oocytes that maintains a stable number of germ cells. This idea, in opposition to the established dogma in reproductive biology, has generated much controversy, which has intensified over the past 2 decades, creating opinions for and against the existence of a mechanism of neo-oogenesis in the adult mammalian ovary (Gosden, 2013).

In mammals, the existence of GSCs has caused great controversy. Several research groups have argued that

¹All correspondence to: Norma Moreno-Mendoza. Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228 México, D.F. 04510 México. Tel: +52 55 56 22 38 66. E-mail: angelica@biomedicas.unam.mx

²Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228, México D.F. 04510, México.

GSCs do not exist in adult mammalian ovaries and are present only in the testes, in which sperm production is derived from a population of self-renewing cells known as spermatogonial stem cells (SSCs) that are present in males of all species studied (Regaud, 1901; Brinster, 2007). Considering that females ovulate only a few hundred oocytes during a portion of their life, evolutionarily, they do not require these cells (Monget *et al.*, 2012), contrary to invertebrates and fish, which require a pool of renewable GSCs due to their high reproduction rates throughout the year.

Primordial germ cells

The primordial germ cells (PGCs) are the first population of germ cells established during development and are the precursor cells of oocytes and sperm in the ovaries and testes, respectively. In mice, PGCs are first identified by their affinity for alkaline phosphatase at 7.25 embryonic day (E7.25) emerging from the posterior primitive streak in extraembryonic mesoderm (Chiquoine, 1954; Ginsburg *et al.*, 1990; Leitch *et al.*, 2013). Subsequently, PGCs migrate through the region in which the gonads are forming passing through the hindgut endoderm around E7.75 to the dorsal mesentery around E9.5 and colonizing the genital ridges at E10.5 (Saitou & Yamaji, 2012). Molyneaux and colleagues (2001) described distinct phases of PGCs migration, the first, until E9.0–E9.5, PGCs are already highly mobile, but do not leave the gut. Second, in the E9.0–E9.5 period, before the mesentery forms, PGCs very rapidly exit the gut, but do not migrate towards the genital ridges. Third, during the E10.0–E10.5 period, PGCs migrate directionally from the dorsal body wall into the genital ridges. Finally, at E11.5, PGCs are slowing and the direction of movement is dependent on the sex of the embryo. PGCs proliferate as they migrate, rapidly increasing in number to approximately 100 cells at E8.5 and to 25,000 at E13.5 (Ewen & Koopman, 2010).

Sex-specific differences in the gonads are evident by E12.5 and this represents a convenient endpoint of PGCs development (Sasaki & Matsui, 2008). In female embryos, PGCs begin the process of meiosis to reduce their genetic material. Notably, PGCs are unable to divide mitotically once they enter the first phase of meiotic division (Hilscher *et al.*, 1974; Speed, 1982). These cells undergo considerable epigenetic reprogramming, including chromatin modification, allowing the downregulation of genes from somatic cells such as those from the HOX family (*Hoxa1*, *Hoxb1*, *Lim1* and *Evx1*), which are repressed in cells destined to become germ cells (Saitou *et al.*, 2002). This downregulation permits both pluripotency in genes and activation of genes characteristic of the germ cell

lineage, in particular *Prdm1* (also known as *Blimp1*) and *Prdm14*. During their specification and migration, PGCs are highly pluripotent and are characterized by the expression of genes such as *Oct-4*, *Sox2* and *Nanog*, but during ovarian development, these genes are substantially downregulated around E13.5 (Western *et al.*, 2010), just before entry into meiosis.

Oogenesis

The onset of meiosis is crucial for ovarian morphogenesis, which involves folliculogenesis and oogenesis. The onset of meiosis is executed by the action of retinoic acid (RA), which is present in the gonadal environment and activates pre-meiotic gene expression of *Stra8* (Stimulated by Retinoic Acid 8) in ovarian germ cells (Koubova *et al.*, 2006; Bowles & Koopman, 2007; Griswold *et al.*, 2012; Mu *et al.*, 2013). Recently, it has become apparent that a second gene called *Rec8* (meiotic recombination protein), which encodes a component of the cohesin complex, is essential for meiosis; it has been thought that *Rec8* is another target of RA and is activated independently of *Stra8* (Koubova *et al.*, 2014).

Once meiosis begins, a layer of granulosa cells begins to enclose the oocytes, forming primordial follicles. Many oocytes that are not surrounded by somatic cells undergo apoptosis, determining the pool of primordial follicles (Sanchez & Smitz, 2012). These follicles become primary follicles when granulosa cells become columnar and undergo mitotic division to form a multi-layered stratum granulosum and oocytes grow to more than 20 microns in size. At this stage of folliculogenesis, numerous genes are activated, such as the transcription factor *Figla*, which is expressed exclusively in germ cells and regulates the transcription of zona pellucida genes (*ZP1*, *ZP2* and *ZP3*) (Liang *et al.*, 1997), and *Nobox*, which restricts oocyte growth and limits the development of granulosa cells to seven layers, although primordial follicles appear histologically normal, as evidenced from mouse knockouts (Rajkovic *et al.*, 2004). During folliculogenesis, the oocyte responds to luteinizing hormone, resuming meiosis and completing maturation. Reactivation of meiosis and promotion through metaphase involves a complex signaling cascade based on epidermal growth factor (Park *et al.*, 2004). The mitogen-activated protein kinase pathway is activated in the granulosa cells of the pre-ovulatory follicle to maintain the oocyte in a state of arrest (Downs, 2010) while regulating the permeability of cyclic guanosine monophosphate through junctions between granulosa cells and the oocyte (Norris *et al.*, 2008). Oocyte maturation is completed after arrest in metaphase II, and completion of meiosis occurs exclusively with fertilization and

extrusion of the second polar body, leaving a haploid female pronucleus (Li & Albertini, 2013).

Dogma of reproductive biology

During the 1920s, Pearl and Schoppe asserted that the number of oocytes does not increase during the life of an individual (Pearl & Schoppe, 1921), an idea that was later corroborated by the British zoologist Sir Solomon Zuckerman. In 1951, Zuckerman published a report that provided a careful review of the oocyte numbers of various animal species (rat, mouse, rhesus monkey, rabbit, dog, guinea pig and human) at various ages and noted that the number of oocytes of each species decreased with increasing age. This report led to the basic doctrine of reproductive biology, which argues that during fetal development, female mammals have the potential to generate a limited stock of oocytes, which are surrounded by somatic cells (granulosa cells) and form follicles that are unable to divide (Zuckerman, 1951; Zuckerman & Baker, 1977). Likewise, another group reached the same conclusion, showing that oocyte formation in mouse ovaries takes place only during the fetal period of life, decreases with female age and is depleted in menopause (Peters *et al.*, 1962).

Currently, the central dogma of reproductive biology has been questioned because experimental evidence suggests the existence of stem cells with germ cell characteristics and mitotic activity in the ovarian surface epithelium (OSE) of the adult ovary (Johnson *et al.*, 2004). The function of these cells is to form a small reserve of undifferentiated cells that are capable of self-renewal to maintain a constant number of oocytes, a mechanism that has been called neo-oogenesis. Accordingly, there are two main stances: one that is sceptical of neo-oogenesis and supports the idea of the existence of a fixed number of oocytes established before birth (the classic idea in reproductive biology) and a second that strongly supports the existence of germ stem cells (GSCs) with mitotic activity in the germinal epithelium of adult ovaries that maintain a stable number of oocytes (neo-oogenesis). It has also been indicated in various sources that a reservoir of GSCs that migrate to the ovary exists, an assertion that has added controversy by creating greater discord concerning this hypothesis.

Evidence of neo-oogenesis

The first report to discuss the existence of a renewable source of adult stem cells in the ovaries was presented by Heinrich Waldeyer-Hartz a German anatomist and

physiologist (1870). While not firmly accepting the existence of GSCs, the report indicated that the OSE is active for a limited period. Subsequently, Kingery (1917) reaffirmed this idea, stating that the oocytes degenerated during fetal life are restored by oocytes that develop in the germinal epithelium of the adult ovary. These findings were used to argue that new oocytes emerge from the germinal epithelium as a result of the mitotic division of undifferentiated cells (Allen, 1923; Allen & Creadick, 1937; Esmaeilian *et al.*, 2015). Moreover, classic histological works have showed oogonia with mitotic activity and oocytes in the early stages of meiotic prophase in adult ovaries of lower primates *Galago senegalensis* (Gerard, 1920, 1932; Gerard & Herlant, 1953; Herlant, 1961; Petter-Rousseaux, 1962; Butler, 1964), *G. crassicaudatus* (Gerard & Herlant, 1953), *G. demidoffi* (Gerard, 1932; Gerard & Herlant, 1953; Petter-Rousseaux, 1962), and *Perodicticus potto* (Gerard & Herlant, 1953), a prosimian lemuroide *Loris tardigradus lydekkerianus* (Rao, 1927; Brambell, 1930) and in *Daubentonia madagascariensis* (Petter-Rousseaux & Bourliere, 1965). It has also been argued that new germ cells are formed by direct transformation of somatic cells of the germinal epithelium of the ovary (Gerard, 1920, 1932; Gerard & Herlant, 1953; Rao, 1927).

Later, in 1967, Ioannou examined ovaries from adult prosimians and noted that oogonia at interphase or in various stages of mitosis undoubtedly occurred in adult female *Loris* and *Perodicticus* species of Galago (Ioannou, 1967). These findings and studies by Anand Kumar (1966) suggest that although few signs of mitotic activity were observed in ovaries from adult *Loris*, an examination of numerous ovaries from mature specimens of this species have shown that germ cells occur at all stages of mitosis. Oocytes at the successive stages of meiosis up to diplotene are also present, often in great numbers. While oogonia may occasionally be observed in the germinal epithelium, there is no reason to believe that such cells are derived from transformed epithelial cells. It is more likely that all germ cells in the adult prosimian ovary are derived from daughter cells of pre-existing oogonia, as is known to be the case for all other mammals studied (Franchi *et al.*, 1962). However, these findings are not currently relevant and are regarded as an exception to the rule.

The concept of neo-oogenesis resurfaced when the Johnson group proposed that mitotically active germ cells, which are capable of replacing oocytes lost through atresia and ovulation, are found in the ovaries of young and adult mice, thereby maintaining a stable pool of follicles (Johnson *et al.*, 2004). By counting follicles using mathematical models, it was estimated that up to 33% of immature follicles in adult mice are atretic at any given moment, which

depletes the ovarian reserve in a shorter time than usually occurs. This discrepancy between the rate of follicle loss and the mouse reproductive life suggest the existence of an alternative source of oocytes. Using the Vasa markers MVH or Ddx4 (DEAD-box helicase 4), which are characteristic of the germline in all vertebrates, and SCP3 (synaptonemal complex protein 3), a marker of meiotic cells in the ovaries of young and adult mice, cells were identified in the OSE. Some MVH-positive cells were also positive for bromodeoxyuridine (BrdU), a synthetic nucleoside that is incorporated into the newly synthesized DNA of replicating cells and indicates cell division rather than DNA repair, suggesting that these cells may be able to support follicular renewal. Treatment with busulphan, a chemical widely used to specifically deplete germinal cells in their migration stage, revealed ovaries possess fewer than 5% of the primordial follicle pool present in non-treated ovaries. In addition, busulphan-exposed ovaries showed healthy maturing follicles with non-degenerative oocytes and corpus luteum indicative of ovulation. Finally, ovarian fragments of wild-type mice grafted into the ovarian cavity of transgenic mice expressing the reporter gene GFP (green fluorescent protein) resulted in oocytes that express GFP surrounded by wild-type granulosa cells not positive for GFP. Taken together, these results suggest the existence of GSCs in the adult mammalian ovary that maintain folliculogenesis during postnatal life (Johnson *et al.*, 2004; Skaznik-Wikiel *et al.*, 2007; Hanna & Hennebold, 2014). Similarly, it has been demonstrated that an injection of the histone deacetylase trichostatin A rapidly and significantly increases the number of primordial follicles in young mice, young adults and adult females. These data identify epigenetic modification of chromatin structure as a key regulator for postnatal mammalian oogenesis. Furthermore, receptor signaling of RA and histone acetylation cooperatively interact to influence *Stra8*, which induces the expression of genes in meiosis that promote the formation of oocytes in adult mice (Wang & Tilly, 2010).

Using morphological characteristics, gene expression profiles and oestradiol synthesis, an *in vitro* study of embryonic stem cells (ESCs) from transgenic mice that express GFP indicated spontaneous generation of oocytes that remain enclosed within structures similar to developing ovarian follicles (Hübner *et al.*, 2003). Subsequent work confirmed these findings, revealing that oocytes fail to progress through meiosis and are therefore incompetent for fertilization (Novak *et al.*, 2006). Despite these results, the failure to overcome the defect in meiosis may be resolved in a matter of time, and these experiments establish a starting point, as the possibility of deriving viable sperm from ESCs has been reported (Nayernia *et al.*, 2006).

Various research groups have corroborated the hypothesis of neo-oogenesis through the detection of key markers associated with pluripotency (Oct-3/4, Sox2 and Nanos), proliferation (BrdU), germline cells (Vasa, Fragilis, Stella, and Blimp1), and meiosis (DMCI: disrupted meiotic cDNA and SCP3) in cell groups in the peripheral region of the ovary. MVH protein localization identified the presence of GSCs in the OSE of mouse ovaries. In evaluating the potential proliferation of MVH-positive cells in 5-day-old neonatal and adult mice using BrdU markers, double-positive BrdU-MVH-stained cells were observed in the surface epithelium of the ovary. Based on this result, the double-positive cells were immuno-magnetically isolated and cultured for more than 15 months and cells from adult ovaries for more than 6 months. These cells were observed to retain high telomerase activity and normal karyotype activity during long-term culture; to express germline markers such as Oct-4, MVH, *Dazl*, Blimp-1, Fragilis, Stella and Rex-1; and not to express markers specific to oocytes such as *c-Kit*, *Figla*, *Sox-1*, *Nanog*, SCP1–3 and ZP3. The GSCs were labeled with a reporter gene (*GFP*) and were transplanted into mouse ovaries depleted of germ cells; GSCs experiencing oogenesis were detected and produced offspring expressing the *GFP* transgene (Zou *et al.*, 2009). Moreover, another report showed a population of pre-meiotic germ cells with elevated expression of the *Stra8* and *Dazl* genes in the ovaries of OSE mice. Isolated cells marked with the *GFP* reporter gene retain the capacity to transform into oocytes after being transplanted into the ovaries of juvenile mice, thus increasing the expression of genes such as *Oct-4*, *c-Kit*, *MVH* and *SSEA-1* (Niikura *et al.*, 2009).

The purification and characterization of GSCs has been reported using transgenic mice that express *GFP* under the control of the *Oct-4* promoter. Two cell populations were identified based on their distribution and size. The first population was composed of small cells (10–15 μm) in the OSE, and the second was observed to have larger cells (50–60 μm) morphologically similar to oocytes (oocyte-like cells, OLCs) enclosed by follicular structures. Cells from the first group, or ovarian GSCs, maintained stem cell character and formed embryoid bodies presenting high telomerase activity and normal karyotypes after several stages (Pacchiarotti *et al.*, 2010). In addition to this, small round cells of unknown origin were observed among epithelial cells of OSE in adult human ovaries (Bukovsky *et al.*, 2005; Virant-Klun *et al.*, 2008). Later, these findings were confirmed in rabbit, sheep, monkey and menopausal women, in which were identified two populations of putative stem cells (PSCs), based on their distribution and size. The smaller cells (1–3 μm) expressed factors for

pluripotency as Oct-4 and SSEA-4; whereas bigger cells (4–7 μm) showed cytoplasmic localization of Oct-4 and minimal expression of SSEA-4. The small cells were called very small embryonic-like stem cells (VSEs) because these cells express gene pluripotency (*Oct-4A*, *Nanog*, *Sox2*, *TERT* and *Stat-3*). After culture, these cells were able to differentiate into structures similar to oocytes (OLCs) and expressed *c-Kit*, *Dazl*, *GDF-9*, *VASA* and *ZP4* (Ratajczak *et al.*, 2007; Parte *et al.*, 2011). VSEs are considered to be the descendants of embryonic epiblast derived pluripotency PGCs that while migrating along the dorsal mesentery to the genital ridge, also gets deposited in various somatic tissues (Ratajczak *et al.*, 2014; Bhartiya *et al.*, 2016), as in adult ovaries, bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood (Virant-Klun, 2015). Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates the VSEs, leading to upregulation in *Oct-4A* and *Nanog* expression and promoting the proliferation of these cells in the OSE (Parte *et al.*, 2013).

The search for a mechanism of neo-oogenesis in mammals has extended to domestic animals. In the pig model, experiments have suggested that skin cells from fetal pigs maintained *in vitro* can generate oocytes contained in small follicle-like structures (Dyce & Li, 2006). These presumed germ cells, formed from stem cells in the skin, manifest a meiotic blockage but coordinate the formation of follicular structures capable of secreting significant levels of oestradiol in basal conditions and in response to FSH treatment. Previous studies have also reported that potential oocytes expelled from the follicle-like structures have very similar characteristics to those of ovulated oocytes, with a structure much like the zona pellucida and the interaction and penetration of sperm (Dyce *et al.*, 2006). Another report mentioned that it is possible to isolate oogonial stem cells (OSCs), named for their expression of transcription factors such as *Oct-3/4*, *Nanog* and *Sox2*, among newborn piglets. *In vitro*, these cells showed a high capacity to differentiate into oocytes and OLCs, which express *Vasa*, *Dazl* and *ZPC* (Song *et al.*, 2011). In female adult pigs, putative stem cells (PSCs) in the ovary were isolated and characterized based on their capacity for *in vitro* proliferation and differentiation. PSCs are found in a heterogeneous population in terms of size and have affinity for pluripotent stem cell markers, such as Oct-4 and SSEA4, and germ cell markers, such as Fragilis and *c-Kit*. Molecular analysis of PSCs indicated that these cells undergo a cytoplasmic–nuclear translocation of Oct-4 similarly to gonadal PGCs. Thus, the cells with PGCs characteristics are present or generated in the ovaries of adult pigs, maintain their identity as germ cells under *in vitro* conditions, and reach a difference in OLCs in appropriate culture conditions (Bui *et al.*, 2014). The

authors also suggest that PSCs can be generated from VSEs stem cells as proposed by others.

Isolated ovarian GSCs from neonatal and adult mouse ovaries and expanded them in the same culture conditions as embryonic stem cells (ESCs), were called female germline stem cells (FGSC). The FGSCs formed compact round colonies with unclear borders, maintained ESC characteristics and alkaline phosphatase (AP) activity, expressing germ cell marker *Vasa*, and stem cell markers: Oct4, Klf4, C-myc, *Nanog*, CD49f, *Sox2*, CD133, SSEA1 and SSEA4. These cells had the ability to form embryoid bodies (EBs), which expressed specific markers for all three germ layers. Then it was induced EBs to differentiate into neurons, cardiomyocytes, pancreatic cells and germ cells, which showed the expression of specific markers, β -III-tubulin, cardiac α -actin, *Pdx1* and *Zps* respectively (Hu *et al.*, 2012).

The presence of GSCs with mitotically activity has found in adult mouse ovaries and human ovarian cortical tissue in which a gene expression profile is consistent with pluripotency primitive germ cells (*Blimp1*, *Stella*, *Fragilis*, *Ddx4* and *Dazl*, Oct-4, *Nanog*, and *Sox2*). *In vitro*, these cells can be expanded for months and spontaneously generate oocytes. Injection of the human germline cells, engineered to stably express GFP, into human ovarian cortical biopsies leads to formation of follicles containing GFP-positive oocytes after xenotransplantation into immunodeficient female mice. Thus, ovaries of reproductive-age women, similar to adult mice, possess rare mitotically active germ cells that can be propagated *in vitro* as well as generate oocytes *in vitro* and *in vivo* (White *et al.*, 2012).

Esmailian and colleagues reported in ovaries from pre-puberty and adult old mice, the expression of *Sox2*, *Nanog* and *Oct-4* genes. Oct-4 and *Nanog* were found to be significantly differentiated between 2-week-old and 8-week-old old mice, whereas no significant difference was observed in the expression level of *Sox2*. However, the positive expression of *Sox2* and Oct-4 protein was detected in the cytoplasm of ovarian epithelial cells, granulosa cells, oocytes and theca cells. Meanwhile, *Nanog* protein was observed only in the nucleus of the oocytes and its expression was higher in old ovaries. Thus, the authors suggest that pre-puberty and adult mice ovaries harboring cells with stem cells features arguing that the cytoplasmic expression of Oct-4 and *Sox2* are translocated into the cytoplasm to the nucleus using a nuclear localization sequence and proceed in the opposite direction through the nuclear export sequence (Whiteside & Goodbourn, 1993; Esmailian *et al.*, 2012; Esmailian *et al.*, 2015).

Wild animals have also been used as study models for defining the existence of the neo-oogenesis mechanism. A report on three species of phyllostomid

bats (*Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*) revealed that the ovarian morphology in the three species is similar, clearly distinguishing a cortical region towards the exterior formed by a dense stroma of connective tissue that contains the ovarian follicles in various stages of development, each containing an oocyte and an internal medullar region formed of blood vessels supplying the ovary and mesenchymal cells. A small group of cells identified in the cortical region showed very similar characteristics to PGCs, including expression of specific cell markers of the germline (Fragilis, Stella, Vasa and c-Kit), stem cells (Oct-4) and cell proliferation (pH3). Thus, these cells have been called adult cortical germ cells (ACGCs). These results suggest that progenitor cells from the germline form the adult ovary in the phyllostomid bats and that the self-renewal of the germline is a possible function of progenitor cells (Antonio-Rubio *et al.*, 2013).

Human OSE, previously known as germinal epithelium, as this site was thought to serve as the origin of germ cells during embryonic development, has become very important for identifying GSCs. It was thought that the OSE might be the reservoir of undifferentiated cells capable of developing new cells. In this respect, the formation of new primordial follicles has been reported to develop with the accumulation of oocytes with nests of primitive granulosa cells in the ovarian cortex.

Research by Virant-Klun has provided surprising results and much encouragement for women who have fertility problems. This research described the presence of cells with characteristics similar to germline cells in the OSE of infertile women without oocytes and therefore without follicles. In these experiments, OSE of postmenopausal women and young women with premature ovarian failure were scraped, and PSCs with characteristics of germline OLCs that spontaneously generated the capacity to form blastocyst-like structures *in vitro* were isolated (Virant-Klun *et al.*, 2008, 2009). The authors also mentioned that these cells express some pluripotency markers, such as Oct-4, Sox2, Nanog, SSEA-4, Klf4 and c-Myc, just after scraping and during cultivation (Virant-Klun *et al.*, 2011a). In the OSE of adult women diagnosed with serous papillary adenocarcinoma, the expression of pluripotency (SSEA-4 and Sox2) and germline (Vasa and ZP2) markers was detected (Virant-Klun *et al.*, 2011b). Later, this same group published a report on the isolation of SSEA-4-positive cells from the OSE of adult females using two strategies: magnetic activated cell sorting and FACS (Virant-Klun *et al.*, 2013a; Virant-Klun *et al.*, 2013b). Immunohistochemistry showed that these small PSCs express the major markers of pluripotency (Oct-4A, Sox2, SSEA-4, Sall4, Cdh1 and Lefty1) and PGC markers (Prdm1, Prdm14 and

Dppa3). The finding of *Prdm1* is critical because is the determining gene for PGCs, plays an important role in tandem with *Prdm14* for specifying the PGCs in the epiblast and is critical to the maintenance of unipotent germ cells (Bao *et al.*, 2012; Esmaeilian *et al.*, 2015). *In vitro*, these cells develop as OLCs in the presence of follicular fluid and express marker characteristics for oocytes (ZP3, SCP3 and c-Kit) (Virant-Klun *et al.*, 2013a, 2013c).

Despite evidence indicating the existence of GSCs and thus the capacity of the ovaries to produce and maintain a stable number of oocytes throughout adulthood, a question remains: why do women go through menopause? It is thought that women enter menopause when the finite supply of oocytes is exhausted. However, the existence of GSCs and the concept of neo-oogenesis do not match what happens physiologically in adult women. The justification for this discrepancy is that GSCs, like many other cells, undergo an aging process and thus lose their capacity to regenerate and differentiate. Other alternatives to this idea have been proposed. One of these arguments is that there must be some fault in the cascade of genetic and/or hormonal signaling that does not permit GSCs to differentiate into oocytes. Other alternatives are that the differentiated somatic environment does not provide the right atmosphere to trigger the development of oocytes, the GSCs do not work properly, or that no environment allows their proper differentiation (Monget *et al.*, 2012). Another is that GSCs do not exist in the adult ovary. This last explanation has had more recognition, and greater numbers of arguments demonstrate this point, as we shall see in the next section.

In summary, this evidence suggests the existence of stem cells of the germline in the postnatal mammalian ovary. However physiological relevance, ovarian function and its possible role in maintaining fertility are still unclear, and it leaves major questions to be determined. Although controversy still exists today on the biological significance of these cells, identification and isolation clearly represents a significant advance for reproductive biology, running as an attractive method for infertility (Hummitzsch *et al.*, 2015).

Arguments against neo-oogenesis

Despite the reports that corroborate the mechanism of neo-oogenesis, there are those that deny its existence because of an inability to identify and/or corroborate the published data supporting neo-oogenesis. In this regard, recent research has opened perspectives to discuss the importance of the initial follicle pool in

fertility in female adult mammals. Utilizing a mathematical model of the dynamics of follicle progression, the Bristol-Gould group examined whether the initial follicle pool is sufficient for adult fertility through reproductive senescence in mice. Establishing two mechanisms: an initial pool of primordial follicles as the only follicle source (fixed pool model) and an initial primordial follicle pool supplemented by GSCs (stem cell model), they found that the stem cell model failed to describe the observed decreases in follicles over time and did not parallel the accumulation and subsequent reduction in primary follicles during the early fertile lifespan of the mouse. Thus, they concluded that the initial endowment of ovarian follicles is not supplemented by an appreciable number of stem cells; rather, the initial pool of oocytes is sufficient to ensure the fertility of the adult female mouse, and that the loss of follicle in mouse ovary is not a stochastic process regulated both prior to puberty and again in the adult life (Bristol-Gould *et al.*, 2006). Faddy & Gosden showed that female mammals produce a limited number of oocytes, however the authors mention that the absence of evidence is not evidence of absence, the inference that total and primordial follicle numbers behave postnatally as if there is no renewal and only depletion would seem entirely reasonable, is what the statistics say (Faddy & Gosden, 2009).

Likewise, the absence of expression of early genes of meiosis, such as *Spo11*, *Prdm9*, *SCP1-3*, and *DMC1*, for germ cell development *Oct-3/4*, *c-Kit*, *Vasa* and *Nobox* and for proliferation *TERT*, *PCNA* and *Ki-67*, in healthy human ovaries between 28 and 53 years has been reported, concluding that neo-oogenesis does not take place in the adult human ovary (Liu *et al.*, 2007). Other studies that were designed to confirm the circulation of oocyte stem cells in the blood and their capacity to migrate to the ovary and form new follicles have not produced evidence to support this hypothesis (Begum *et al.*, 2008). Similarly, the Zhang group reported that it was not possible to identify the presence of Ddx4-positive germ cells or gene transcription related to *SCP1*, *SCP3* and *Spo11* meiotic activity in the OSE of adult rats (Zhang *et al.*, 2010). Later, this same group showed Ddx4-expressing cells in postnatal mouse ovaries; however, these cells were not able to divide mitotically or contribute to oocyte formation, arguing against previous results (Zhang *et al.*, 2012). In this respect and in support of the arguments against neo-oogenesis, it has also been reported that it is not possible to confirm the existence of GSCs through histological studies or the expression of markers of pluripotent cells and germ cells (SSEA-4, Oct-4 and Nanog) in the postnatal human ovary during the first 2 years of life (Byskov *et al.*, 2011). Similarly, reports by Kerr and colleagues investigated the hypothesis that adult mice have the capacity to generate new

oocytes by monitoring primordial follicle numbers throughout postnatal life and following depletion of the primordial follicle reserve by exposure to doxorubicin (DXR), trichostatin A (TSA), or whole-body γ -irradiation, in adult C57BL/6 mice between the ages of 25 and 100 days. After 2 days of treatment, primordial follicle numbers had declined to 65 with DXR and 51% with TSA, with no restoration of follicle numbers evident after 7 days for either treatment. The ovaries from mice sterilizing with γ -irradiation (0.45 or 4.5 Gy) revealed complete ablation of all primordial follicles 5 days after treatment, no indication of follicular renewal. Finally, we conclude that neo-folliculogenesis does not occur following chemical or γ -irradiation mediated depletion of the primordial follicle reserve (Kerr *et al.*, 2012).

Other studies denying the existence of GSCs and neo-oogenesis *in vivo*, except in adult mouse ovaries, were made by Lei & Spradling (2013). They measured the follicular stability in mice at 4 weeks of age by administering low doses of tamoxifen (Tmx) and analysing the ovaries at various periods by cutting them into series at each time point and estimating the total number of follicles. All germ cells appeared to be oocytes within follicles based on morphological criteria, clarifying that morphology was insufficient to rule out primordial follicles and germ cells in a state of pre-follicular development. They also calculated the volume of follicles by plotting Log_{10} [primordial follicles yellow fluorescent protein (YFP) +/ovary] over time. The slope indicated that individual follicles are slowly flushed out within a half-life ($t_{1/2}$) of 11 months, confirming that the pool of primordial follicles together manifests stably with a half-life of 10 months. This finding suggested that there is a marked follicular stability between primordial follicles and the total number of primordial follicles and no significant production of new primordial follicles. Subsequently, the ovaries of females treated with Tmx were analysed. The number of YFP-positive cells was assessed in comparison with E10.5 embryos, in which 100% of PGCs were proliferating, and with adult male mice 4 weeks of age, in which 100% of testes showed clusters of cells marked with YFP (CGSs, spermatogonial germ cells). However, after evaluating 1000 germ cells in adult females treated with Tmx, germ cells marked on or adjacent to the surface of the ovary were never observed, indicating that the marking system functioned properly, as somatic (granulosa) cells were observed to be YFP-positive. They concluded that, together, these experimental results rule out the existence of GSCs in adult ovaries because direct measurements showed that the primordial follicles are highly stable and invalidate the inference that thousands of adult primordial follicles flow out each month. They also claimed that marked follicles are

lost at the same rate as total follicles, negating the existence of a source of new follicles in adulthood. Finally, as additional evidence, they referred to the follicles produced during fetal development, which are sufficiently stable to meet all requirements in adult life (Lei & Spradling, 2013). Parallel to these investigations, Yuan and colleagues did not identify proliferating cells or gene expression of pluripotency markers, such as Sox2 and Lin28, or the germline markers Vasa and Dazl in adult ovaries of rhesus monkeys and mice. Unexpectedly, cells with characteristics of somatic stem cells but not germline cells were found in adult ovaries (Yuan *et al.*, 2013).

With the continued publication of reports for and against possible neo-oogenesis, a final consensus on whether the mechanism of neo-oogenesis or, likewise, GSCs exist in the ovaries of adult mammals has not yet been reached. The existence of this mechanism remains unknown and still requires much more work to fully prove or disprove the notion that mammalian ovaries have cells with characteristics similar to the PGCs that can be stimulated to enter a differentiation process for the generation of new oocytes.

Studies that support and reject the role of an extra-gonadal source of germline stem cells in neo-oogenesis during adulthood

It has been suggested that GSCs that cause oocytes to emerge in postnatal stages reside in extra-gonadal reservoirs, meaning that these cells originate outside the ovary, then migrate in an undifferentiated state and when they reach the adult ovary they begin their process of differentiation and commitment towards oocytes, thus compensating for any follicles lost during each ovulatory cycle.

Reports published so far have suggested that the bone marrow acts as the GSC reservoir. This idea was derived from the fact that during early embryogenesis the hematopoietic cells and germ cells originate in the same region, so in adult life they can be found in the same niche (Johnson *et al.*, 2005b; Hanna & Hennebold, 2014). The expression of germline markers has been localized, such as Ddx4, Dazl, Stella and Fragilis in bone marrow cells and interestingly Ddx4 expression appears to fluctuate in coordination with the estral cycle of the individual and is absent in ovariectomized females. Experiments on the ovarian follicles of chemically depleted mice, subject to bone marrow transplantation, revealed follicle formation after treatment. These results were confirmed employing Atm mutant mice (mutated ataxia telangiectasia), which are infertile as they do not have the ability to produce mature

germ cells, and thus do not develop oocytes. Once bone marrow transplantation had been performed, the formation of follicles was identified. These findings led to the hypothesis that GSCs reside in the bone marrow and travel through the peripheral blood to colonize the ovary (Johnson *et al.*, 2005). To test this theory, this group used Atm mice and mice that were germ cell deficient, due to chemotherapy. Both models were given a peripheral blood transfusion from a transgenic mouse (GFP), resulting in the detection of MVH-expressing GFP oocytes (*Vasa* homolog gene), *HDAC6* (histone deacetylase 6) and *NOBOX* (homeobox protein NOBOX, also known as newborn ovary homeobox protein), concluding that the GSCs are derived from the bone marrow and circulate via blood.

An analogous work derived from the same Johnson group showed that germ cell conditioned mice and monthly infusions of bone marrow-derived cells from young adult females bearing the *GFP* reporter gene were able to sustain the fertility potential of the recipient individual, extending its timespan until reproductive senescence (Selesniemi *et al.*, 2009). Contrastingly, when evaluating the reproductive capacity of females treated with cytotoxic chemicals to eliminate germ cells, they observed that mice that were undergoing chemotherapy were infertile. In contrast, mice that received a bone marrow transplant achieved term pregnancies. In comparison, there was a slight reduction in the number of offspring per litter among mice undergoing non-lethal treatment (busulfan 12 mg/kg, cyclophosphamide 120 mg/kg) plus transplantation compared with untreated controls. Although bone marrow transplantation reactivated long-term fertility in treated organisms, all offspring produced by these animals were derived from the recipient's own germ cells as all offspring were GFP negative. Therefore, the effects of bone marrow transplantation do not appear to have any positive effects on the re-establishment of germ cells, the authors proposed that the transplant acted as a chemotherapy protector and not as an activator of neo-oogenesis (Lee *et al.*, 2007). These results further increased mistrust in the theory of neo-ovogenesis, and criticisms soon emerged. One of the first works that questioned the results obtained by Johnson and colleagues (2005), which related bone marrow transplantation to restoration of fertility, was that of Eggan *et al.* (2006). This study involved parabiosis experiments with wild-type mice and *GFP* transgenic mice to determine whether circulating GSCs derived from bone marrow could cause oocytes to originate in the ovary. By surgically joining blood vessels at around 4–8 weeks of age, they observed that the highest level of peripheral blood chimerism is 65% for GFP-positive leukocytes on both sides, 6–8 months

post-surgery. Although ovulation occurred in both groups, no chimeric oocytes were detected, although GFP-positive cells were occasionally observed in the wild-type mouse group. Following treatment with cyclophosphamide and busulfan, administered 1 day prior to surgical union of blood vessels in wild-type mice, they observed a high leukocyte chimerism in blood and bone marrow but not in oocytes; however these mice manifested ovulation at around 2 weeks or 2 months after surgery. They therefore concluded that any fertility post-treatment could be attributed to follicles not affected by chemotherapy that made it possible to re-establish the number of follicles. This was corroborated by mice that were treated but surgically unattached, which showed the presence of follicles in reduced numbers, indicating incomplete oocyte ablation (Eggen *et al.*, 2006).

In order to test if oocyte progenitor cells circulate in the blood and are able to migrate to the ovary and form new follicles, they performed a positive GFP blood transfusion in wild-type ovaries. An examination of oocytes present in ovarian grafts found no evidence to support this hypothesis (Begum *et al.*, 2008). Finally, a further report (Santiquet *et al.*, 2012) that refuted the presence of GSCs in bone marrow and peripheral blood was obtained for SCDI mice, treated with chemical agents. When analysing embryonic ovarian cortex grafts there was no evidence that transplanted bone marrow cells resulted in new oocytes. However, they suggested that transplanted bone marrow cells improve fertility in SCID mice, positively influencing ovarian physiology.

The role of epigenetic mechanisms during oogenesis and neo-oogenesis

With the advent of epigenetics, some of the biochemical and cellular pathways that led to some developmental abnormalities caused by changes in chromatin have been determined that in turn control differential gene expression by DNA methylations and histone alterations. Currently, the epigenetic pathways that regulate the development of oogenesis have been described, and disturbances associated with this process have been shown to damage postnatal health causing infertility (Bromfield *et al.*, 2008).

Epigenetics has reinforced the idea of a Lamarckian evolutionary principle because environmental conditions have led to marked changes in gene expression during mammalian development (Bromfield *et al.*, 2008). Any stress factor that affects the embryo during development may influence gene expression and thus disrupt competency for embryo development. Changes in the state of intracellular redox will alter

the expression of oxygen-sensitive genes (Harvey *et al.*, 2007), while exposure to environmental toxins will alter gene expression and capacity for embryonic development (Susiarjo *et al.*, 2007).

The production of fertility-competent oocytes results from good coordination between folliculogenesis and oogenesis, a good balance of cellular interactions between the somatic and germinal components, as well as hormonal interactions and growth factors involved in the pituitary–hypothalamic–gonad axis (Combelles *et al.*, 2004). However, alterations in somatic physiology can affect the quality of the oocytes depending on the stage of development affected; fetal, prepubertal or adult (Bromfield *et al.*, 2008). Considering epigenetic regulation at a more subtle but equally important level, molecular mediators have been identified to fulfill a crucial catabolic function, in many systems. Relevant epigenetic factors in oocytes include: cMOS (r), which participates in the arrest of meiosis II and whose absence deregulates the cell cycle; E-cadherin (p), which is involved in the compaction of chromatin, whose absence causes damage to lineage assignment; NMP2 (p), which influences pronuclear maturation, whose absence causes delay in the cell cycle; and Dmmt1o (p), which is important for the methylation of chromatin and whose deficiency causes modifications in methylation; and γ -tubulin (P), also important for mitosis, as its absence results in arrest of the cell cycle. Key factors in the cell cycle assume a non-random location in order to generate fast and complete effects, ensuring the synchronized activation of the kinase and ubiquitination, for an opportune entry into the M cell phase and to ensure its exit. In contrast, the centrosomes work by limiting the diffusion capacity of components involved in the progression of the cell cycle, as the complexity of these factors or molecules are directed and maintained in the centers of microtubule organization (COMT). Finally, the spindle serves to harbor and stabilize many factors that are involved in timely cyclin degradation that provokes the metaphase–anaphase transition, during the M phase (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). Specific interactions between the cytoskeleton and other organelles, mRNAs and proteins can be localized and stabilized together for post-translational modification (revised by Bromfield *et al.*, 2008). Advancement in this developing area has led to the proposal of epigenetic mechanisms that may possibly be associated with neo-oogenesis process.

It has been suggested that oogenesis can be induced in adult females with the inhibitors histone deacetylases (HDAC) and trichostatin A (tSA), indicating that the acetylation status of histones can determine whether germ cells enter meiosis (Johnson *et al.*, 2005b). This work provided a precept for further investigation into epigenetic regulation and

Table 1 Experimental works that uphold the existence of a mechanism of neo-ovogenesis in adult mammalian females

Year	Author	Model	Relevance
1870	Waldeyer-Hartz	Theoretical	He indicates that the ovarian superficial epithelium (OSE) is active during a limited period in the early life of organisms
1917	Kingery	Mouse	He reports that oocytes that degenerated during fetal life were replaced by oocytes that evolved in the germinal epithelium of the adult ovary.
1923	Allen	Mouse	They argue that new oocytes arise from the germinal epithelium, as a result of the mitotic division of undifferentiated cells.
1965	Crone <i>et al.</i>	Mouse	Identification of oval cells in the OSE of mice, similar to germ cells of fetal ovaries.
1966	Anand Kumar	Prosimians	Observation of germ cells at different stages of mitosis (oogonias), or during the meiotic prophase (oocytes) indicating that the process of ovogenesis in prosimians continues after birth.
1967	Ioannou	Prosimians	Description of the presence of germ cells in prosimian ovaries, identifying oogonias during interphase and at different stages of mitosis, by autoradiography. However, the possibility that these germ cells are formed by the pre-existing division of oogonias is not ruled out.
1967	Duke	Prosimians	Localization of mitotically active germ cells in adult ovaries. He states that germ cells are grouped into nests within the ovarian cortex and that these are capable of incorporating tritiated thymidine.
1974	David <i>et al.</i>	Prosimians	They confirm previous observations about the active incorporation of tritiated thymidine, analysing the behavior of the germinal cells of the cortex, during a period of sexual inactivity (anestrus) in <i>Loris tardigradus lydekkerianus</i> . The appearance of marked germ cells in ovaries takes place, indicating mitosis and DNA synthesis during estrus and anestrus.
2004	Johnson <i>et al.</i>	Mouse	They suggested that there are germ stem cells GSCs in the superficial epithelium of the ovary in adult mice that express the germ cell marker Mvh and exhibit mitotic activity, evidenced by the expression of BrdU at levels that consistently indicate cell division.
2004	Bukovsky <i>et al.</i>	Human	They propose that the mesenchymal cells of the tunica albuginea are bipotential progenitors that give rise to germ cells and granulosa. The latter originate in the OSE by means of epithelial–mesenchymal transition.
2005(a)	Johnson <i>et al.</i>	Mouse	They postulate that a bone marrow transplant (BMT) can restore oocyte generation in wild-type mice sterilized by chemotherapy and in mice with a genetic disorder that made them unable to produce oocytes.
2005(b)	Johnson <i>et al.</i>	Mouse	They suggest that peripheral blood is an additional source of GSCs in mice, suggesting that putative germ cells are located in the bone marrow (BM) and released into peripheral circulation.
2005	Bukovsky <i>et al.</i>	Human	They show the potential for differentiation of superficial ovarian epithelial cells into oocytes, granulosa cells, nerve cells, epithelial cells and mesenchymal cells.
2006	Kehler <i>et al.</i>	Mouse	They demonstrate that oocytes were spontaneously generated from embryonic stem cells ESCs and then kept enclosed within structures resembling the developing ovarian follicles, determined by morphological characteristics, gene expression profiles and estradiol synthesis.
2006	Kerr <i>et al.</i>	Mouse	They mention that immature germ cells in the adult ovary can lead to the generation of new oocytes.
2006	Dyce <i>et al.</i>	Pig	They show that skin cells from cultured pig fetuses are able to generate oocytes contained in small follicle-like structures.
2007	Lee <i>et al.</i>	Mouse	They argue that bone marrow transplantation is not effective as protective chemotherapy, unless it functions as an activator of ovogenesis, caused by the action of GSCs that replenish oocytes lost from the effects of cytotoxic chemicals, such as cyclophosphamide and busulfan. <i>CABLES1</i> is an essential gene, associated with limiting the rate of oocyte turnover in adult mouse ovaries.
2008	Zhang <i>et al.</i>	Mouse	They identified the expression of meiotic and germ cell markers in specific cells grouped together at the periphery of the ovaries of adult mice.
2008	Szotek <i>et al.</i>	Mouse	They mention that a population of label-retaining cells (LRCs), located in the OSE of transgenic adult mice (H2B–GFP) exhibit stem/progenitor cell characteristics.

Table 1 Continued

Year	Author	Model	Relevance
2008	Virant-Klun <i>et al.</i>	Human	They isolated putative stem cells with germline characteristics expressing pluripotency markers (SSEA4, Oct-4, Nanog, Sox-2 and c-Kit) from postmenopausal women and those with premature ovarian failure.
2009	Zou <i>et al.</i>	Mouse	They identified GSCs in the OSE by colocalizing MVH and BrdU proteins. These cells were isolated immunomagnetically and then cultivated, revealing a normal karyotype, high telomerase activity and the expression of pluripotency and germline genes (<i>Oct4</i> , <i>Mvh</i> , <i>Dazl</i> , <i>Blimp1</i> , <i>Fragilis</i> , <i>Stella</i> and <i>Rex-1</i>). Expression of c-Kit, Figla, Sox-1, Scp1–3 and ZP3 that would indicate differentiation to oocytes was not detected.
2009	Niikura <i>et al.</i>	Mouse	They located a pre-meiotic germ cell population in the OSE of mouse ovaries with high expression of the <i>Stra8</i> and <i>Dazl</i> gene, capable of differentiating into oocytes, once transplanted into ovaries of juvenile mice.
2009	Virant-Klun <i>et al.</i>	Human	They obtained putative stem cells from postmenopausal women that were maintained <i>in vitro</i> and that proliferated and formed structures similar to embryoid bodies, expressing Oct-4, c-Kit, <i>Mvh</i> and <i>Zp2</i> . They identified structures similar to the zona pellucida, germinal vesicle and polar bodies, concluding that differentiation to oocytes had occurred.
2010	Pacchiarotti <i>et al.</i>	Mouse	They identified two populations of GFP/Oct4 positive cells based on their distribution and size. The first group formed from small cells located in the OSE they denominated GSCs and these maintained characteristics of stem cells forming embryoid bodies, presenting high telomerase activity and a normal karyotype after several stages. The second group consisted of large oocyte-like cells (OLCs) and were encased in follicular structures.
2010	Gong <i>et al.</i>	Mouse	Adult ovarian cells cultured with fibroblasts can produce colonies that manifest similar activity to that of ESCs.
2011	Parte <i>et al.</i>	Rabbit; Sheep; Mono Rhesus; Human	They identified small cells called VSELs expressing pluripotency genes: Oct4, Nanog, Sox2, TERT and Stat-3, which having been cultured manifested an ability to differentiate into oocyte-like structures (OLCs) and which expressed c-Kit, <i>Dazl</i> , <i>Mvh</i> and ZP3.
2011a or 2011b	Virant-Klun <i>et al.</i>	Human	They identified a cell population with Sox2-positive germ cell characteristics in the OSE of women with premature ovarian failure, who had high levels of FSH and LH. They report that in culture with follicular fluid, these express alkaline phosphatase, Oct4, Sox2, SSEA-4 Nanog, Nanos, <i>Stella</i> , CD9, Lin28, Klf4, GDF3, and Myc.
2011	Song <i>et al.</i>	Pig	They isolated oogonial stem cells (OSCs) expressing Oct4, Nanog and Sox2. In culture these cells showed high capacity to differentiate into OLCs, evidenced by the expression of <i>Mvh</i> , <i>Dazl</i> and ZP3.
2012	White <i>et al.</i>	Mouse; Human	They report that isolated mouse and human cells in culture generate spontaneous differentiation to oocytes. Xenotransplantation experiments of human ovary cortical cells to immune-deficient mice manifest formation of chimeric follicles.
2012	Esmailian <i>et al.</i>	Mouse	They demonstrate the expression of pluripotency genes; Oct4, Sox2 and Nanog, in ovaries of prepubertal and adult mice.
2012	Bhartiya <i>et al.</i>	Human	By applying treatment with FSH, they report that it is possible to induce stimulus in the pluripotent VSELs, leading to the overexpression of Oct4A and Nanog and promoting the proliferation of the cells present in the OSE, evidenced by the expression of PCNA.
2012	Hu <i>et al.</i>	Mouse	They identify round and compact cells that form colonies with alkaline phosphatase (AP) activity in adult ovaries. They observe expression of germline markers (<i>Mvh</i>) and stem cells (Oct4, Klf4, c-Myc, Nanog, CD49f, Sox2, CD133 and SSEA1–4). <i>In vitro</i> , porcine follicular fluid induces their differentiation into oocyte-like structures.
2012	Bukovsky & Caudle	Rat	They report follicular renovation in rodents by bone marrow-derived cells, which interact with ovarian epithelial cells of adult rats, lacking OSE.
2013	Antonio- Rubio <i>et al.</i>	Bats	In the cortical region of adult ovaries, they identified a population of cells morphologically very similar to PGCs, called adult cortical germinal cells, which express proliferation markers (pH3), pluripotency (Oct4) and germ line (<i>Dppa3</i> , <i>IFITM3</i> , c-Kit and <i>Mvh</i>)

Table 1 Continued

Year	Author	Model	Relevance
2013	Parte <i>et al.</i>	Human	They observed proliferation of stem cells in the OSE and a transition from primordial follicles to primary follicles, following treatment with FSH and bFGF, suggesting that FSH and bFGF stimulate the stem cells present in the OSE to form follicles.
2013	Patel <i>et al.</i>	Mouse	They show that the follicle-stimulating hormone (FSH) modulates OSCs through FSH-R3 for their self-renewal, clonal expansion as 'cysts' and their differentiation into oocytes.
2013	Bhartiya <i>et al.</i>	Human	They show the presence of ovarian cysts that present self-renewal and clonal expansion, as well as incomplete cytokinesis, characteristics that are distinctive to stem cells. They indicate the expression of Oct4 and Stella, suggesting the presence of stem cells.
2013	Stimpfel <i>et al.</i>	Human	They identify the presence of cells that express pluripotency and germline markers in the ovarian cortex of adult women.
2013a	Virant-Klun <i>et al.</i>	Human	They report the isolation of SSEA-4 positive cells present in the OSE of adult women, and demonstrate that these putative small stem cells express principal pluripotency markers (Oct4A, Sox2, SSEA-4, Sali4, CDH1 and Lefty1) and markers of primordial germ cells (PRDM1, PRDM14, and Dppa3).
2013	Park <i>et al.</i>	Mouse	They suggest that the signaling of bone morphogenetic proteins (BMP4) can directly affect OSC function, producing rapid phosphorylation regulated by Smad proteins. This activates key meiosis genes (<i>Stra8</i> , <i>MSX1</i> and <i>MSX2</i>)
2014	Bui <i>et al.</i>	Pig	They identified, isolated and characterized putative ovarian stem cells (PSCs), based on capacity for in vitro proliferation and differentiation. They suggest that PSCs are generated or are present in the ovary of adult pigs, maintaining their germ cell identity.
2011	Parte <i>et al.</i>	Human; Sheep	They demonstrate a recapitulation of in vitro ovogenesis in OSE cells and show differential expression of specific markers for pluripotent VSELs (nuclear Oct4A, SSEA-4, and CD133), OSCs (cytoplasmic OCT4), primordial germ cells (Fragilis, Stella, and Mvh) and oocytes (DAZL, GDF-9 and Scp3).
2015	Sriraman <i>et al.</i>	Mouse	The culture of OSEs exposed to chemotherapy showed proliferation and formation of germ cell groups. These manifested spontaneous differentiation to structures similar to oocytes, and on day 6 were observed to be positive to Mvh, and GDF9.
2016	Ding <i>et al.</i>	Human	They demonstrate that OSCs can be recovered from follicular fluid due to the presence of traces of ovarian cortex tissue in follicular aspirates. These cells also differentiated into oocytes during the germinal vesicle stage in vitro.
2016	Guo <i>et al.</i>	Mouse	They argue that active GSCs, which are functional under physiological conditions, are present in the ovary of adult mice.

Table 2 Experimental works that refute the existence of a mechanism of neo-ovogenesis in adult mammalian females

Year	Author	Model	Relevance
2006	Bristol-Gould <i>et al.</i>	Mouse	They argue, through statistical analysis and mathematical models, that female mammals produce a limited number of oocytes in fetal life, ceasing production after birth.
2007	Liu <i>et al.</i>	Human	They do not identify the expression of pluripotency genes (Oct4 and c-Kit) and meiosis (<i>Spo11</i> , <i>PRDM9</i> , <i>Scp1</i> , <i>TERT</i> and <i>Nobox</i>) in adult ovaries of healthy women, thus refuting the existence of neo-ovogenesis.
2010	Zhang <i>et al.</i>	Rat	They do not identify GSCs by morphology or by the expression of characteristic germline markers; <i>Mvh/Vasa</i> and meiosis (<i>Scp1</i> , <i>Scp3</i> and <i>Spo11</i>).
2011	Byskov <i>et al.</i>	Human	They found no expression of typical pluripotency markers such as <i>SSEA-4</i> , <i>Oct4</i> and <i>Nanog</i> in 2-year-old human ovaries, so they state that there are no GSCs in postnatal ovaries.
2012	Zhang <i>et al.</i>	Mouse	They present evidence that <i>Mvh/Ddx4</i> positive cells are not mitotic, so they do not contribute to the formation of oocytes in the adult ovary.
2012	Kerr <i>et al.</i>	Mouse	They indicate that no neo-folliculogenesis occurred in mice after sterilization treatment with doxorubicin (DXR) or Y-rays, negating the existence of GSCs.
2012	Oatley & Hunt	Theoretical	They mention that doubts about the existence of OSCs will persist until evidence is provided to indicate that these cells give rise to viable eggs in the adult.
2013	Yuan <i>et al.</i>	Mono Rhesus; Mouse	They do not identify presence of proliferative cells in the adult ovaries of Rhesus monkey and mouse. Neither do they detect the expression of pluripotency genes (<i>Sox2</i> and <i>Lin28</i>) and germ line (<i>Mvh/Vasa</i> and <i>Dazl</i>)
2013	Lei & Spradling	Mouse	Using a labeling system, they determined that the ovaries of adult mice lack stem cells, as primordial follicles generated during fetal development are stable enough to sustain folliculogenesis without requiring an alternative source of renewal.
2014	Zhang <i>et al.</i>	Mouse	They show that there is no mitotic activity in OSCs or folliculogenesis in the postnatal mouse ovary. They conclude that the pool of oocytes formed during the fetal development of organisms is the only source of germ cells.
2015	Zhang <i>et al.</i>	Mouse; Human	Human and mouse purified OSCs that were positive to DDX4 are neither cells nor do they specifically express DDX4 and nor are they functional germline stem cells.
2017	Vanii <i>et al.</i>	Human	They mention that the existence, origin and functionality of OSCs remain controversial and that this is not yet widely accepted in the scientific community.

how this may influence the production of oocytes during adult life. It is generally known that the meiotic cell cycle is activated by the expression of *Stra8*, which is induced by retinoic acid (RA) in fetal stages of development. The suppression of meiosis in male germ cells is caused by the expression of CYP26B1. When male embryonic germ cells were exposed to the class I/II inhibitors histone deacetylases (HDAC) and trichostatin A (tSA), premature activation of *Stra8* was induced and therefore entry into meiosis without altering expression of CYP26B1 took place. However, the most important finding in terms of neo-ovogenesis was the physiological detection of *Stra8* in ovaries of adult mice.

The induction of ovogenesis in adult females using TSA is associated with the activation of *Stra8*, enabling reproduction of the results with the use of HDAC inhibitor, suberoilanolida of hydroxamic acid (SAHA). This finding indicates that retinoic acid receptor and histone acetylation signaling interact cooperatively to influence *Stra8* expression, which promotes the formation of oocytes in adult mice. The ability of RA to induce *Stra8* expression is epigenetically controlled by co-activators upstream of RARE. Finally, the authors conclude that these events not only coordinate entry of meiosis during embryogenesis, but also contribute significantly to the regulation of ovogenesis in adult mammalian females (Wang & Tilly, 2010). Another explanation of how epigenetics can influence the production of oocytes, maintaining a stable number in adult life, indicates that this is a function of the ovarian reserve. Primordial or non-growth follicles (NGFs) are the functional unit for reproduction, constituting the ovarian reserve (OR). The dynamics of the reserve are determined by the number of NGFs formed and their subsequent destinations. During reproductive life, OR progressively decreases due to follicular atresia, as well as recruitment, maturation and ovulation. OR depletion is controlled by the menopause, when the number of primordial follicles falls below a threshold of ~1000. It is thus important to know the genes and processes involved in the development of OR (Pelosi *et al.*, 2015).

Studies have shown that OR increases dramatically from 15 weeks post-conception to 34 weeks, remaining constant, with an average of 680,000 NGF, up to the first 2 years after birth (Block, 1953; Forabosco & Sforza, 2007; Hansen *et al.*, 2008). In postnatal life, data show considerable variability between 7 and 12 years, thus no figure has been established, although limited reduction has been observed. An average of ~460,000 follicles are still present at puberty; between 12 and 14 years of age (Block, 1952; Hansen *et al.*, 2008). From this moment, OR reduce continually until menopause down to <1000 NGF (Block, 1952; Richardson *et al.*, 1987; Gougeon *et al.*, 1994; Hansen *et al.*, 2008) revised

by Pelosi *et al.* (2015). Changes in follicular dynamics may result from the influence of genetic and/or environmental factors that modify the formation of new NGF or the recruitment of NGF for maturation or atresia (Kerr *et al.*, 2013).

Conclusions

The controversy surrounding the existence of GSCs in adult mammals continues, thus accurate and reproducible results are necessary to demonstrate the existence of the mechanism of neo-oogenesis. If results are attained, GSCs could be used in a clinical context, promoting their isolation, growth and differentiation to provide a novel method for treating female infertility. Finally, after the review of positions both for and against the existence of a mechanism of neo-oogenesis (Table 1 and 2), whether there are cells capable of producing new oocytes in adult mammalian ovaries remains unknown. Therefore, the debate concerning the existence of GSCs in the ovary is not resolved. Before accepting or denying the existence of a mechanism of neo-oogenesis, several pieces of evidence must be provided: irrefutable results showing the existence of GSCs in the adult mammalian ovary, an indication of whether this phenomenon is a generality or represents only certain exceptions in nature; determination of whether this condition is beneficial or detrimental in evolutionary terms; and scientific characterization of GSC existence by their morphology and genetics to determine whether these GSCs play an important physiological role.

Abbreviations

ACGCs, adult cortical germ cells; AR, retinoic acid; BrdU, 5-bromo-2-bromodesoxyuridine; ESCs, embryonic stem cells; FACS, fluorescence activated cell sorting; FSH, follicle-stimulating hormone; GFP, green fluorescent protein; GREL, gonadal ridge epithelial-like; GSCs, germ stem cells; OLCs, oocyte-like cells; OSCs, oogonial stem cells; OSE, ovarian surface epithelium; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PGCs, primordial germ cells; PSCs, putative stem cells; SSCs, spermatogonial stem cells; Tmx, tamoxifen; VSELs, very small embryonic-like stem cells; YFP, yellow fluorescent protein.

Acknowledgements

This paper was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT IN205515.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

Both authors contributed to design of the study, manuscript writing and conception and final design.

References

- Allen, E. (1923). Ovogenesis during sexual maturity. *Am. J. Anat.* **31**, 439–81.
- Allen, E. & Creadick, R.N. (1937). Ovogenesis during sexual maturity. The first stage, mitosis in the germinal epithelium, as shown by the colchicine technique. *Anat. Rec.* **69**, 191–5.
- Anand Kumar, T.C. (1966). Effects of sex-steroids on the reproductive organs of the female Loris. (Abstract.) Proceedings of the Second International Congress on Hormonal Steroids, Milan.
- Antonio-Rubio, N.R., Porrás-Gómez, T.J. & Moreno-Mendoza, N. (2013). Identification of cortical germ cells in adult ovaries from three phyllostomid bats: *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*. *Reprod. Fertil. Dev.* **25**, 825–36.
- Bao, S., Leitch, H.G., Gillich, A., Nichols, J., Tang, F., Kim, S., Lee, C., Zwaka, T., Li, H. & Surani, M.A. (2012). The germ cell determinant *Blimp1* is not required for derivation of pluripotent stem cells. *Cell. Stem Cell.* **11**, 110–7.
- Begum, S., Papaioannou, V.E. & Gosdem, R.G. (2008). The oocyte population is not renewed in transplanted or irradiated adult ovaries. *Hum. Reprod.* **23**, 2326–30.
- Bhartiya, D., Sriraman, K., Gunjal, P. & Modak, H. (2012). Gonadotropin treatment augments postnatal oogenesis and primordial follicle assembly in adult mouse ovaries? *J. Ova. Res.* **5**, 32.
- Bhartiya, D., Sriraman, K., Parte, S. & Patel, H. (2013). Ovarian stem cells: absence of evidence is not evidence of absence. *J. Ova. Res.* **6**, 65.
- Bhartiya, D., Parte, S., Patel, H., Sriraman, K., Zaveri, K. & Hinduja, I. (2016). Novel action of FSH on stem cells in adult mammalian ovary induces postnatal oogenesis and primordial follicle assembly. *Stem Cells Int.* **2016**, doi: 10.1155/2016/5096596. Epub ahead of print.
- Block, E. (1952). Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat.* **14**, 108–23.
- Block, E. (1953). Quantitative morphological investigations of the follicular system in newborn female infants. *Acta Anat.* **17**, 201–6.
- Bowles, J. & Koopman, P. (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* **134**, 3401–11.
- Brambell, F.W.R. (1930). *The Development of Sex in Vertebrates*. London: Sidgwick and Jackson.
- Brinster, R.L. (2007). Male germline stem cells: from mice to men. *Science* **316**, 404–5.
- Bristol-Gould, S.K., Kreeger, P.K., Selkirk, C.G., Kilen, S.M., Mayo, K.E., Shea, L.D. & Woodruff, T.K. (2006). Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev. Biol.* **298**, 149–54.
- Bromfield, J., Messamore, W., Albertini, D.F. (2008). Epigenetic regulation during mammalian oogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**, 74–80.
- Bui, H.T., Van Thuan, N., Kwon, D.N., Choi, Y.J., Kang, M.H., Han, J.W., Kim, T. & Kim, J.H. (2014). Identification and characterization of putative stem cells in the adult pig ovary. *Development* **141**, 2235–44.
- Bukovsky, A. & Caudle, M.R. (2012). Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause *in vivo*, vs. neo-oogenesis *in vitro*, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **10**, 97.
- Bukovsky, A., Caudle, M.R., Svetlikova, M. & Upadhyaya, N.B. (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**, 20.
- Bukovsky, A., Svetlikova, M. & Caudle, R. (2005). Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3**, 17.
- Butler, H. (1964). The reproductive tract of a strepsirhine (*Galago senegalensis senegalensis*). In *International Review of General and Experimental Zoology*, vol. I (eds W.J.L. Felts & R.J. Harrison). New York and London: Academic Press.
- Byskov, A.G., Høyer, P.E., Yding Andersen, C., Kristensen, S.G., Jespersen, A. & Møllgård, K. (2011). No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. *Hum. Reprod.* **26**, 2129–39.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. & Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* **2**, E107–12.
- Chiquoine, A.D. (1954). The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec.* **118**, 135–46.
- Combelles, C.M., Carabatsos, M.J., Kumar, T.R., Matzuk, M.M. & Albertini, D.F. (2004). Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Mol. Reprod. Dev.* **69**, 347–55.
- Crone, M., Levy, E. & Peters, H. (1965). The duration of the premeiotic DNA synthesis in mouse oocytes. *Exp. Cell. Res.* **39**, 678–88.
- David, G.F., Anand Kumar, T.C. & Baker, T.G. (1974). Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender Loris. *J. Reprod. Fertil.* **41**, 447–651.
- Ding, X., Liu, G., Xu, B., Wu, C., Hui, N., Ni, X., Wang, J., Du, M., Teng, X. & Wu, J. (2016). Human GV oocytes generated by mitotically active germ cells obtained from follicular aspirates. *Sci. Rep.* **6**, 28218.
- Downs, S.M. (2010). Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 566–85.
- Duke, K.L. (1967). Ovogenetic activity of the fetal-type in the ovary of the adult slow loris, *Nycticebus coucang*. *Folia primatologica; Inter. J. Primatol.* **7**, 150–254.
- Dyce, P.W. & Li, J. (2006). From skin cells to ovarian follicles? *Cell Cycle* **5**, 1371–5.

- Dyce, P.W., Wen, L. & Li, J. (2006). *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat. Cell Biol.* **8**, 384–90.
- Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I.M., Wagers, A.J. (2006). Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* **441**, 1109–14.
- Esmailian, Y., Gur Dedeoglu, B., Atalay, A. & Erdemli, E. (2012). Investigation of stem cells in adult and prepuberal mouse ovaries. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **3**, 936–44.
- Esmailian, Y., Atalay, A. & Erdemli, E. (2015). Post-natal oogenesis: a concept for controversy that intensified during the last decade. *Zygote*. **23**, 315–26.
- Ewen, K.A. & Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol. Cell. Endocrinol.* **323**, 76–93.
- Faddy, M. & Gosden, R. (2009). Let's not ignore the statistics. *Biol. Reprod.* **81**, 231–2.
- Forabosco, A. & Sforza, C. (2007). Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Fertil. Steril.* **88**, 675–83.
- Franchi, L.L., Mandl, A.M. & Zuckerman, S. (1962). The development of the ovary and the process of oogenesis. In *The Ovary* (ed. S. Zuckerman), pp. 1–88. London: Academic Press.
- Gerard, P. (1920). Contribution à l'étude de l'ovaire des mammifères. L'ovaire de *Galago mossambicus* (Young). *Archs. Biol.* **20**, 357–91.
- Gerard, P. (1932). Etudes sur l'ovogenèse et ontogenèse chez les lemuriens du genre *Galago*. *Archs. Biol.* **43**, 93–151.
- Gerard, P. & Herlant, M. (1953). Persistence of phenomena of oogenesis in adult lemuriens. *Archs. Biol.* **64**, 97–111.
- Ginsburg, M., Snow, M.H. & McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* **110**, 521–8.
- Gong, S.P., Lee, S.T., Lee, E.J., Kim, D.Y., Lee, G., Chi, S.G., Ryu, B.K., Lee, C.H., Yum, K.E., Lee, H.J., Han, J.Y., Tilly, J.L. & Lim, J.M. (2010). Embryonic stem cell-like cells established by culture of adult ovarian cells in mice. *Fertil. Steril.* **93**, 2594–601.
- Gosden, R.G. (2013). Oocyte development and loss. *Semin. Reprod. Med.* **3**, 393–8.
- Gougeon, A., Ecochard, R. & Thalabard, J.C. (1994). Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol. Reprod.* **50**, 653–63.
- Griswold, M.D., Hogarth, C.A., Bowles, J. & Koopman, P. (2012). Initiating meiosis: the case for retinoic acid. *Biol. Reprod.* **86**, 35.
- Guo, K., Li, C.H., Wang, X.Y., He, D.J. & Zheng, P. (2016). Germ stem cells are active in postnatal mouse ovary under physiological conditions. *Mol. Hum. Reprod.* **22**, 316–28.
- Hanna, C.B. & Hennebold, J.D. (2014). Ovarian germline stem cells: an unlimited source of oocytes? *Fertil. Steril.* **101**, 20–30.
- Hansen, K.R., Knowlton, N.S., Thyer, A.C., Charleston, J.S., Soules, M.R. & Klein, N.A. (2008). A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum. Reprod.* **23**, 699–708.
- Harvey, A.J., Kind, K.L. & Thompson, J.G. (2007). Regulation of gene expression in bovine blastocysts in response to oxygen and the iron chelator desferrioxamine. *Biol. Reprod.* **77**, 93–101.
- Herlant, M. (1961). L'activité génitale chez la femelle de *Galago senegalensis moholi* (Geoffr.) et ses rapports avec la persistance de phénomènes d'ovogenèse chez l'adulte. *Ann. Soc. Roy. Zool.* **91**, 1–15.
- Hilscher, B., Hilscher, W., Bulthoff-Ohnolz, B., Kramer, U., Birke, A., Pelzer, H. & Gauss, G. (1974). Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell Tissue Res.* **154**, 443–70.
- Hu, Y., Bai, Y., Chu, Z., Wang, J., Wang, L., Yu, M. & Hua, J. (2012). GSK3 inhibitor-BIO regulates proliferation of female germline stem cells from the postnatal mouse ovary. *Cell. Prolif.* **45**, 287–98.
- Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F. 3rd, Boiani, M. & Scholer, H.R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* **300**, 1251–6.
- Hummitzsch, K., Anderson, R.A., Wilhelm, D., Ji Wu, J., Telfer, E.E., Russell, D.L., Robertson, S.A. & Raymond, J. Rodgers R.J. (2015). Stem cells, progenitor cells, and lineage decisions in the ovary. *Endocr. Rev.* **36**, 65–91.
- Ioannou, J.M. (1967). Oogenesis in adult prosimians. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **17**, 139–45.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K. & Tilly, J.L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. **428**, 145–50.
- Johnson, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H.J., Niikura, Y., Tilly, J.C. & Tilly, J.L. (2005a). Setting the record straight on data supporting postnatal oogenesis in female mammals. *Cell Cycle* **4**, 1471–7.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H.-J., Adams, G.B., Niikura, Y., Tschudy, K.S., Tilly, J.C., Cortes, M.L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D.T. & Tilly, J.L. (2005b). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells derived from bone marrow and peripheral blood. *Cell* **122**, 303–15.
- Kehler, J., Hübner, K. & Schöler, H.R. (2006). Derivation of germ cells from embryonic stem cells. *Ernst Schering Res. Found Workshop*. **2006**, 125–42.
- Kerr, J.B., Duckett, R., Myers, M., Britt, K.L., Mladenovska, T. & Findlay, J.K. (2006). Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* **132**, 95–109.
- Kerr, J.B., Brogan, L., Myers, M., Hutt, K.J., Mladenovska, T., Ricardo, S., Hamza, K., Scott, C.L., Strasser, A. & Findlay, J.K. (2012). The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or γ -irradiation mediated depletion. *Reproduction* **143**, 469–76.
- Kerr, J. B., Myers, M. & Anderson, R.A. (2013). The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction* **146**, R205–15.
- Kingery, H.M. (1917). Oogenesis in the white mouse. *J. Morphol.* **30**, 261–315.

- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D. & Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2474–9.
- Koubova, J., Hu, Y.C., Bhattacharyya, T., Soh, Y.Q., Gill, M.E., Goodheart, M.L., Hogarth, C.A., Griswold, M.D. & Page, D.C. (2014). Retinoic acid activates two pathways required for meiosis in mice. *PLoS Genet.* **10**, e1004541.
- Lee, H.J., Selesniemi, K., Niikura, Y., Niikura, T., Klein, R., Dombkowski, D.M. & Tilly, J.L. (2007). Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3198–204.
- Lei, L. & Spradling, A.C. (2013). Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using stable primordial follicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 8585–90.
- Leitch, H.G., Tang, W.W. & Surani, M.A. (2013). Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* **104**, 149–87.
- Li, R. & Albertini, D.F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **14**, 141–52.
- Liang, L., Soyal, S.M. & Dean, J. (1997). FIGalpha a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* **124**, 4939–47.
- Liu, Y., Wu, C., Lyu, Q., Yang, D., Albertini, D.F., Keefe, D.L. & Liu, L. (2007). Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev. Biol.* **306**, 112–20.
- Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K. & Wylie, C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev. Biol.* **240**, 488–98.
- Monget, P., Bobe, J., Gougeon, A., Fabre, S., Monniaux, D. & Dalbès-Tran, R. (2012). The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* **356**, 2–12.
- Mu, X., Wen, J., Guo, M., Wang, J., Li, G., Wang, Z., Wang, Y., Teng, Z., Cui, Y. & Xia, G. (2013). Retinoic acid derived from the fetal ovary initiates meiosis in mouse germ cells. *J. Cell. Physiol.* **228**, 627–39.
- Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W., Lee, J.H., Rathack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.E., Elliott, D.J., Okpanyi, V., Zechner, U., Haaf, T., Meinhardt, A., Engel, W. (2006). *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring in mice. *Dev. Cell.* **11**, 125–32.
- Niikura, Y., Niikura, T. & Tilly, J.L. (2009). Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Ageing* **1**, 971–8.
- Norris, R.P., Freudzon, M., Mehlmann, L.M., Cowan, A.E., Simon, A.M., Paul, D.L., Lampe, P.D., & Jaffe, L.A. (2008). Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* **135**, 3229–38.
- Novak, I., Lightfoot, D.A., Wang, H., Eriksson, A., Mahdy, E. & Höög, C. (2006). Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* **24**, 1931–6.
- Oatley, J. & Hunt, P.A. (2012). Of mice and (WO) men: purified oogonial stem cells from mouse and human ovaries. *Biol. Reprod.* **86**, 196.
- Pacchiarotti, J., Maki, C., Ramos, T., Marh, J., Howerton, K., Wong, J., Pham, J., Anorve, S., Chow, Y.C. & Izadyar, F. (2010). Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation* **79**, 159–70.
- Park, J.Y., Su, Y.Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.L. & Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* **303**, 682–4.
- Park, E.S., Woods, D.C. & Tilly, J.L. (2013) Bone morphogenetic protein 4 promotes mammalian oogonial stem cell differentiation via Smad1/5/8 signaling. *Fertil. Steril.* **100**, 1468–75.
- Parte, S., Bhartiya, D., Telang, J., Daithankar, V., Salvi, V., Zaveri, K. & Hinduja, I. (2011). Detection, characterization, and spontaneous differentiation *in vitro* of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. *Stem Cell Dev.* **20**, 1451–64.
- Parte, S., Bhartiya, D., Manjramkar, D.D., Chauhan, A. & Joshi, A. (2013). Stimulation of ovarian stem cells by follicle stimulating hormone and basic fibroblast growth factor during cortical tissue culture. *J. Ova. Res.* **6**, 20.
- Patel, H., Bhartiya, D., Parte, S., Gunjal, P., Yedurkar, S. & Bhatt, M. (2013). Follicle stimulating hormone modulates ovarian stem cells through alternatively spliced receptor variant FSH-R3. *J. Ova. Res.* **6**, 52.
- Pearl, R. & Schoppe, W.F. (1921). Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. XVIII. Further observations on the anatomical basis of fecundity. *J. Exp. Zool.* **34**, 100–18.
- Pelosi, E., Forabosco, A. & Schlessinger, D. (2015). Genetics of the ovarian reserve. *Front. Genet.* **6**, 308.
- Peters, H., Leavy, E. & Crone, M. (1962). Deoxyribonucleic acid synthesis in oocytes of mouse embryos. *Nature* **195**, 915–6.
- Petter-Rousseaux, A. (1962). Recherches sur la biologie de la reproduction des primates inferieurs. *Mammalia* **26**, 1–87.
- Petter-Rousseaux, A. & Bourliere, F. (1965). Persistence des phenomenes d'ovogenese chez l'adulte de *Daubentonia madagascariensis* (Prosimii, Lemuriformes). *Folia Primat.* **3**, 241–5.
- Rajkovic, A., Pangas, S.A., Ballow, D., Suzumori, N. & Matzuk, M.M. (2004). NOBOX deficente disrupts early folliculogenesis and oocyte-specification gene expression. *Science* **305**, 1157–9.
- Ratajczak, M.Z., Machalinski, B., Wojakowski, W., Ratajczak, J. and Kucia, M.A. (2007). A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct4⁺ stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Lukemia* **21**, 860–67.
- Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E., Wojakowski, W., Suszynska, M., Mierzejewska, K., Liu, R., Ratajczak, J., Shin, D.M. and Kucia, M. (2014). Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia* **28**, 473–84.

- Rao, C.R.N. (1927). On the structure of the ovary and ovarian ovum of *Loris lydekkerianus*. *Quart. J. Micr. Sci.* **71**, 57–74.
- Regaud, C. (1901). Etudes sur la structure des tubes seminiferes et sur la spermatogenese chez les mammiferes. Part 1. *Archives d'Anatomie microscopiques et de Morphologie experimentale*. **4**, 101–56.
- Richardson, S.J., Senikas, V. & Nelson, J.F. (1987). Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **65**, 1231–7.
- Saitou, M. & Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, pii: a008375
- Saitou, M., Barton, S.C. & Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* **418**, 293–300.
- Sanchez, F. & Smitz, J. (2012). Molecular control oogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 1896–912.
- Santiquet, N., Vallières, L., Pothier, F., Sirard, M.A., Robert, C. & Richard, F. (2012). Transplanted bone marrow cells do not provide new oocytes but rescue fertility in female mice following treatment with chemotherapeutic agents. *Cell Reprogram.* **14**, 123–9.
- Sasaki, H. & Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 129–40.
- Selesniemi, K., Lee, H.J., Niikura, T. & Tilly, J.L. (2009). Young adult donor bone marrow infusions into female mice postpone age-related reproductive failure and improve offspring survival. *Aging (Albany NY)*. **1**, 49–57.
- Skaznik-Wikiel, M., Tilly, J.C., Lee, H.J., Niikura, Y., Kaneko-Tarui, T., Johnson, J. & Tilly, J.L. (2007). Serious doubts over 'Eggs forever?' *Differentiation*. **75**, 93–9.
- Song, S.H., Kumar, B.M., Kang, E.J., Lee, Y.M., Kim, T.H., Ock, S.A., Lee, S.L., Jeon, B.G. & Rho, G.J. (2011). Characterization of porcine multipotent stem/stromal cells derived from skin, adipose and ovarian tissues and their differentiation *in vitro* into putative oocyte-like cells. *Stem Cell Dev.* **20**, 1359–70.
- Speed, R.M. (1982). Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. *Chromosoma* **85**, 427–37.
- Sriraman, K., Bhartiya, D., Anand, S. & Bhutda, S. (2015). Mouse ovarian very small embryonic-like stem cells resist chemotherapy and retain ability to initiate oocyte-specific differentiation. *Reprod. Sci.* **22**, 884–903
- Stimpfel, M., Skutella, T., Cvjeticanin, B., Meznicar, M., Dovc, P., Novakovic, S., Cerkovnik, P., Vrtacnik-Bokal, E. & Virant-Klun, I. (2013). Isolation, characterization and differentiation of cells expressing pluripotent/multipotent markers from adult human ovaries. *Cell Tissue Res.* **354**, 593–607
- Susiarjo, M., Hassold, T.J., Freeman, E. & Hunt, P.A. (2007). Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet.* **3**, e5.
- Szotek, P.P., Chang, H.L., Brennard, K., Fujino, A., Pieretti-Vanmarcke, R., Lo Celso, C., Dombkowski, D., Preffer, F., Cohen, K.S., Teixeira, J. & Donahoe, P.K. (2008). Normal ovarian surface epithelial label-retaining cells exhibit stem/progenitor cell characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 12469–73.
- Vanni, V.S., Viganò, P., Papaleo, E., Mangili, G., Candiani, M. & Giorgione, V. (2017). Advances in improving fertility in women through stem cell-based clinical platforms. *Expert Opin. Biol. Ther.* **17**, 585–93.
- Virant-Klun, I. (2015). Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem Cell Cloning* **20**, 49–60.
- Virant-Klun, I., Zech, N., Rozman, P., Vogler, A., Cvjeticanin, B., Klemenc, P., Malicev, E. & Meden-Vrtovec, H. (2008). Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation* **76**, 843–56.
- Virant-Klun, I., Rozman, P., Cvjeticanin, B., Vrtacnik-Bokal, E., Novakovic, S., Rüllicke, T., Dovc, P. & Meden-Vrtovec, H. (2009). Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cells Dev.* **18**, 137–49.
- Virant-Klun, I., Skutella, T., Stimpfel, M. & Sinkovec, J. (2011a). Ovarian surface epithelium in patients with severe ovarian infertility: a potential source of cells expressing markers of pluripotent/multipotent stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 381928.
- Virant-Klun, I., Skutella, T., Cvjeticanin, B., Stimpfel, M. & Sinkovec, J. (2011b). Serous papillary adenocarcinoma possibly related to the presence of primitive oocytes-like cell in the adult ovarian Surface epithelium: a case report. *J. Ova. Res.* **4**, 13.
- Virant-Klun, I., Skutella, T., Hren, M., Gruden, K., Cvjeticanin, B., Vogler, A. & Sinkovec, J. (2013a). Isolation of small SSEA-4-positive putative stem cells from the ovarian surface epithelium of adult human ovaries by two different methods. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 690415.
- Virant-Klun, I., Stimpfel, M., Cvjeticanin, B., Vrtacnik-Bokal, E. & Skutella, T. (2013b). Small SSEA-4-positive cells from human ovarian cell cultures: related to embryonic stem cells and germinal lineage? *J. Ova. Res.* **6**, 24.
- Virant-Klun, I., Skutella, T., Kubista, M., Vogler, A., Sinkovec, J. & Meden-Vrtovec, H. (2013c). Expression of pluripotency and oocyte-related genes in single putative stem cells from human adult ovarian surface epithelium cultured *in vitro* in the presence of follicular fluid. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 861460.
- Waldeyer-Hartz, W.V. (1980). Eierstock und Ei Ein Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Sexualorgane. Leipzig: Engelmann. [In German].
- Wang, N. & Tilly, J.L. (2010). Epigenetic status determines germ cell meiotic commitment in embryonic and postnatal mammalian gonads. *Cell Cycle* **9**, 339–49.
- Western, P.S., van den Bergen, J.A., Miles, D.C. & Sinclair, A.H. (2010). Male fetal germ cell differentiation involves complex repression of the regulatory network controlling pluripotency. *FASEB J.* **24**, 3026–35.
- White, Y.A., Woods, D.C., Takai, Y., Ishihara, O., Seki, H. & Tilly, J.L. (2012). Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat. Med.* **18**, 413–21.
- Whiteside, S.T. & Goodbourn, S. (1993). Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcriptional factor activity by subcellular localization. *J. Cell. Sci.* **1993** **104**, 949–55.

- Yuan, J., Zhang, D., Wang, L., Liu, M., Mao, J., Yin, Y., Ye, X., Liu, N., Han, J., Gao, Y., Cheng, T., Keefe, D.L. & Liu, L. (2013). No evidence for neo-oogenesis may link to ovarian senescence in adult monkey. *Stem Cells* **31**, 2538–50.
- Zhang, D., Fouad, H., Zoma, W.D., Salama, S.A., Wentz, M.J. & Al-Hendy, A. (2008). Expression of stem and germ cell markers within nonfollicle structures in adult mouse ovary. *Reprod. Sci.* **15**, 139–46.
- Zhang, P, Lv, L.X. & Xing, W.J. (2010). Early meiotic specific protein expression in post-natal rat ovaries. *Reprod. Domest. Anim.* **45**, e447–53.
- Zhang, H., Zheng, W., Shen, Y., Adhikari, D., Ueno, H. & Liu, K. (2012). Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 12580–5.
- Zhang, H., Liu, L., Li, X., Busayavalasa, K., Shen, Y., Hovatta, O., Gustafsson, J.Å. & Liu, K. (2014). Life-long *in vivo* cell-lineage tracing shows that no oogenesis originates from putative germline stem cells in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 17983–8.
- Zhang, H., Panula, S., Petropoulos, S., Edsgård, D., Busayavalasa, K., Liu, L., Li, X., Risal, S., Shen, Y., Shao, J., Liu, M., Li, S., Zhang, D., Zhang, X., Gerner, R.R., Sheikhi, M., Damdimopoulou, P., Sandberg, R., Douagi, I., Gustafsson, J.Å., Liu, L., Lanner, F., Hovatta, O. & Liu, K. (2015). Adult human and mouse ovaries lack DDX4-expressing functional oogonial stem cells. *Nat. Med.* **21**, 1116–8.
- Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q, Zhang, Y., Hou, R. & Wu, J. (2009). Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat. Cell. Biol.* **11**, 631–6.
- Zuckerman, S. (1951). The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog. Horm. Res.* **6**, 63–108.
- Zuckerman, S. & Baker, T.G. (1977). The development of the ovary and the process of oogenesis. In *The Ovary* (ed. S. Zuckerman), ch. 2, pp. 41–59. London: Academic Press.



Gonadal morphogenesis and establishment of the germline in the phyllostomid bat *Sturnira lilium*



Tania Janeth Porras-Gómez, Adriana Martínez-Juárez, Norma Moreno-Mendoza*

Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228, D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Sturnira lilium
Germ cells
Embryonic development
Limb development
Testicular differentiation
Ovarian differentiation

ABSTRACT

In vertebrates such as the mouse and the human, primordial germ cells (PGCs) arise at the base of the allantois and are carried to the epithelium of the posterior intestine, to later migrate to the primordial gonads. In the case of bats, almost nothing is known about this process. To clarify the dynamics of PGCs during gonadal morphogenesis in the phyllostomid bat *Sturnira lilium*, the proteins for the *Ddx4*, *Sox9* and *Mis* genes were detected in the gonads of embryos at different stages of development. We identified 15 stages (St) of embryonic development in *Sturnira lilium*. We found that the formation of the genital ridge and the establishment of the undifferentiated gonad take place between stages 11 and 14. The onset of morphological differentiation in the gonad is first detected in the male gonads at St17. The first PGCs in meiosis are detected in the ovary at St19, whereas in the testicles, the PGCs were in mitotic arrest. Structural changes leading to testicular and ovarian development in *Sturnira lilium* are observed to be similar to those described for the mouse; however, differences will be established concerning the time taken for these processes to occur.

1. Introduction

The order Rodentia (mice and rats), is the model most commonly used to study the mechanisms of sexual determination and differentiation in mammals, due to their short gestation period, the large number of progeny and the genetic knowledge that has been generated. This knowledge has led to the identification of a determining factor for testicular differentiation, known as *Sry* (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990; Koopman et al., 1991; Zhao and Koopman, 2012). This gene, located on the short arm of the Y chromosome, directs the cascade of morphological, molecular and physiological events that leads to testicular differentiation, and thus to male development. In addition to the discovery of the *Sry* gene, a large number of autosomal genes have been identified, which are also involved in the processes of sexual differentiation (Donahoe et al., 1977; Morais da Silva et al., 1996; Wilhelm et al., 2005; Svngen and Koopman, 2013). Although knowledge acquired from rodents is extremely valuable, it is important to recognize that they present a whole series of reproductive and developmental adaptations. This means that a complete picture of the sexual development of mammals cannot be obtained by studying one or two species within a single order. This type of study undertaken in wild species is scarce, and in the case of bats, is practically non-existent.

Among mammals, bats occupy the second most diverse order in

terms of species, and today, specialists agree that there are more than a thousand species worldwide (Simmons and Conway, 2001). Bats are members of the order Chiroptera, whose name is derived from the Greek symbols $\chi\epsilon\iota\rho\omicron\zeta$, “cheiros” -hand- and $\pi\tau\epsilon\rho\omicron\nu$, “pteron” -wing-, meaning, “with wings in the hands.” Two suborders are found within the order Chiroptera: the megachiroptera, comprising a single family; and the microchiroptera, comprising 18 families (Nowak, 1999). Like all mammals, bats are born with hair, gestation period varies depending on the species, and the young are fed with breast milk during the early stages of their development. Unlike other small mammals, bats have a relatively long gestation period, ranging from 50 days in some vespertilionids (Ryan, 1963; Dwyer, 1966; Green, 1966; McKean and Hamilton-Smith, 1967; Phillips and Inwards, 1985), and up to 11 months, as in the case of *Haplonycteris fischeri* (Heideman, 1989).

In Mexico, there is a great diversity in terms of chiroptero fauna: 140 species, grouped into eight families, with the phyllostomid family having the greatest biodiversity (55 spp) (Balmori, 1999). Within this family, we cannot indicate a typical reproduction pattern due to the remarkable variety of trophic guilds, as well as their morphological adaptations and even novel reproductive behaviors presented by some members. This study describes the case of the little yellow shouldered bat, *Sturnira lilium*. This bat exhibits a bimodal polystrictive reproductive pattern (Fleming et al., 1972), as well as a bimodal pattern

* Corresponding author.

E-mail address: angelica@biomedicas.unam.mx (N. Moreno-Mendoza).

of pregnancy and lactation peaks, but pregnancy has been recorded during all months of the year (Nowak, 1999). The exact gestation period is unknown; in other phyllostomids, the duration has been observed to vary between four and seven months (Grzimek, 1990). Females give birth to a single offspring, but births occur twice a year, once towards the end of the dry season and once during the mid to late stages of the rainy season (Stoner, 2001). Biologists dispute whether this seasonal pattern of labor is triggered by food availability or temperature changes (Mello et al., 2008). Offspring are born with well-developed limbs and their eyes open. The young reach sexual, or reproductive, maturity between 8 and 11 months of age (Gannon et al., 1989; Kurta and Kunz, 1987; Mello et al., 2008).

With respect to the phylogenetic origin of bats, a very controversial hypothesis has been established about “flying primates”, where it has been speculated that megabats are more closely related to primates than microbats (Volleth et al., 2002). Therefore, the question of whether all bats can be classified within the monophyletic order (chiroptera) or the diplotic order is being debated (Baker et al., 1991). An analysis of the expression of the *Sry* gene in adult stages in small and large bats conducted by Bullejos et al. (2000), maintains that this group of mammals is of monophyletic origin.

However, despite the knowledge of reproductive patterns in several species of bats, evidence related to the mechanisms for sexual determination and differentiation and how this is related to the available knowledge about rodents is limited. Therefore, in the present work, we study the processes of gonadal sexual differentiation and its relationship with embryonic development in the phyllostomid bat, *Sturnira lilium*.

2. Material y methods

2.1. Animals

We used pregnant *Sturnira lilium* females. Specimens were collected in the municipality of Yautepec, Morelos, Mexico, with permission granted by the Under-Secretary of Management for Environmental Protection, General Directorate of Wildlife (SEMARNAT; SGPA/DGVS/09713/13, SGPA/DGV/10841/14 y SGPA/DGVS/12332/15). The town of Yautepec is located in the north of the Morelos State at an altitude of 1210 m above sea level, with a warm sub-humid climate, summer rainfall, and vegetation consisting of low deciduous forest. Bats were captured during the night using mist nets placed between vegetation and transported in cloth sacks for experimental work. Six collections were carried out between May and October in 2014, 2015 and 2016, during which a total of 36 pregnant females were obtained. The *Sturnira lilium* females were identified using the field codes described by Medellín et al. (2008) for this species in Mexico. Only specimens with complete ossification of the cartilaginous epiphyseal growth plates of the fourth phalanx-metacarpal and apparently pregnant, indicated by palpation, were transported to the Institute of Biomedical Research, UNAM for experimental analysis.

2.2. Conservation status

The *Sturnira lilium* bat species used in this study is not on any conservation list in Mexico. Its status is considered of minor concern, and the population is reported as stable in its natural habitat (Arita and Ceballos, 1997; IUCN, 2012)

2.3. Bat embryos

All laboratory procedures were performed complying with the ethical standards for animal experiments of the Institute of Biomedical Research (IIB), UNAM, and following the guidelines for care and use of laboratory animals (National Research Council, 1996). Once in the laboratory, bats were euthanized by administering an intraperitoneal

injection containing an overdose of sodium pentobarbital (0.7 ml per 20 g, SEDAL-VET). Because the captured females were already pregnant, we determined their stage of embryonic development, employing the system described by Cretekos et al. (2005), focusing on the morphological characteristics and buds of limb development in the phyllostomid bat *Carollia perspicillata*. The embryos from the reproductive tracts of the females were dissected, removing the tissue of the decidua and the extraembryonic membranes, including the yolk sac and the amnion. Once isolated and classified, the embryos were processed for subsequent analyses. A single gonad from each embryo was used for morphological analysis using light and electron microscopy, while the contralateral gonad was processed for immunofluorescence analysis.

2.4. Sexual identification of embryos

In embryos where it was not possible to distinguish gonadal sex, sex was established by analyzing the presence or absence of the Barr corpuscle, which corresponds to the inactive X chromosome in females in the nuclei of amniotic cells. For this, we followed the protocol described by Palmer and Burgoyne (1991). Briefly, amnions were obtained from each embryo and fixed in a 1:1 solution of acetic acid-methanol (JT Baker) for 5 min. The sample was briefly centrifuged at 1000 rpm and the supernatant was removed. Subsequently, a drop of 60% acetic acid was added, and the amnion was mechanically disintegrated until only the nuclei remained in suspension. Finally, the nuclei in suspension were placed on a slide, stained with 1% toluidine blue in water and mounted in an aqueous medium for observation under optical microscopy (Nikon, Eclipse E 200).

2.5. Immunofluorescence

Immediately after dissection, gonads were fixed in paraformaldehyde (PFA, 4%/1X PBS, pH 7.1) for 25 min, washed with 1X PBS for 5 min, and placed in 30% sucrose in PBS (Sigma Aldrich) at 4 °C overnight. Samples were soaked in optimum mounting medium for frozen sectioning (OCT; Tissue-Tek, Sakura, CA, USA) and were frozen in hexane (JT Baker) at –70 °C. Subsequently, 20 µm sections were obtained in a cryostat (Leica CM 1850).

An immunofluorescence technique was carried out, following that previously described by Moreno-Mendoza et al. (2004). Briefly, sections were treated with Triton X-100 (1% in PBS) for 10 min, washed with 1X PBS and blocked for 2 h with bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich) at 1%. Sections were incubated separately with polyclonal antibodies against DDX4 proteins (1:500; Abcam ab13840), SOX9 (1:250; Millipore AB5535) and MIS (1:250; SantaCruz sc-6886) diluted in 1% albumin over night at 4 °C. They were then washed with 1X PBS and incubated with anti-rabbit secondary antibodies IgG Rodaminat (Calbiochem 401321), Cy3 anti-rabbit (LifeTechnology A10520) and Cy5 anti-rabbit (LifeTechnology A10523), diluted 1:200 in albumin for 1 h at room temperature. For the simultaneous detection of SOX9 and MIS proteins, sections were fixed again with 4% PFA for 15 min, blocked for two hours with 1% BSA, and the abovementioned incubation steps were repeated with primary and secondary antibodies. Finally, sections were mounted in medium for permanent fluorescence (Dako™) and stored at 4 °C for analysis with a confocal microscope (LSM 5 Pa; Carl Zeiss, Jena, Germany), equipped with Argon-Krypton and Helium-Neon lasers and with BP 450–490 and 546/12 filters.

2.6. Light and electronic microscopy

Ultrastructural analysis of the embryonic gonads was performed following the protocol reported by Antonio-Rubio et al. (2013). Briefly, the gonads were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965) for 24 h at 4 °C, and then incubated in cacodylate buffer (0.1 M at pH 7.4) for 24 h at 4 °C. Tissues were post-fixed in osmium tetroxide (OsO₄; Sigma Aldrich) for 1 h, and dehydrated in gradient solutions of ethanol

(70–100%; JT Baker). Tissues were then placed in acetonitrile (JT Baker) and impregnated with epoxides using 1:1 and 2:1 dilutions with acetonitrile (EMS-JT Baker). Finally, samples were incubated in epon 812 for 24 h and polymerized in plastic blocks at 60 °C for 24 h. For each sample, 1 µm thick semi-fine sections were obtained. These were stained with toluidine blue for observation under a light field microscope. Thin sections of 60–90 nm thickness were also obtained using a Leica ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany); these were placed in copper grids with a diameter of 3 mm, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate for observation under a transmission electron microscope (JEOL-JEM-1010, Jeol, Tokyo, Japan).

2.7. Western blot

Snap-frozen testicle was homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulfate) in the presence of a protease inhibitor mixture and centrifuged at 16,000g for 20 min at 4 °C. Supernatants were collected and stored at –80 °C until use. Total protein content in supernatants was assayed using the Pierce Bicinchoninic Acid protein assay (Thermo Sci, IL, USA). Fifty micrograms of protein from testicle homogenates, diluted in loading buffer (Laemmli 2 × containing 1% β-mercaptoethanol), were separated by electrophoresis on 12% SDS-PAGE home-made gels at 150 V for 60 min and transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a semi dry blot system (Bio-Rad) at 25 V for 50 min. Membranes were blocked in PBS/2% non-fat dry milk overnight at 4 °C and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies DDX4 (1:500; Abcam ab13840), SOX9 (1:500; Millipore AB5535) and MIS (1:200; Santa Cruz sc-6886). After washing with PBS/0.2% Tween, the membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies rabbit anti-goat IgG (Zymed, CA, USA) or goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA) at RT for 1.5 h. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using Super Signal West Dura Extended Duration Substrate kit (Pierce), according to the manufacturer's protocol.

3. Results

3.1. Establishment of development stages

Based on the embryonic criteria for the development of members previously established by Cretokos et al. (2005) for the frugivorous bat *Carollia perspicillata*, 16 stages of embryonic development were identified in the phyllostomid bat *Sturnira lilium* (stages: 11 and those from 14 to 28), for which embryos of both sexes were obtained. Fig. 1 shows 8 of the stages that represent the critical stages of gonadal morphogenesis described in other mammals, such as the mouse and humans. Stage 11 (St11) was determined by the number of somites, with 13 pairs being counted, whereas stages 14–28 were established both by the number of somites and/or by the degree that the anterior and posterior limbs had developed.

3.2. Determination of chromosomal sex

In early stages of development, when it was not possible to distinguish gonadal sex morphologically, the chromosomal sex of the embryos was determined by the presence or absence of sexual chromatin in amniotic cells. The nuclei obtained from embryo amnions during stages 14–16 either presented or did not present the Barr corpuscle, which corresponds to the inactive X chromosome in females. In this case, the presence of 80% or more nuclei with sex chromatin in a field indicated XX embryos (Fig. 2).

3.3. Migration of primordial germ cells (PGCs): establishment of the undifferentiated gonad

It was possible to identify three stages of development in the undifferentiated gonad. The first corresponds to a very early stage (Stage 11), where the gonad is not yet formed, but primordial germ cells (PGCs) could be detected in the migration phase. PGCs were identified at this stage by their expression protein for the *Ddx4* gene and were mainly located within the epithelium of the posterior intestine and the surrounding splanchnic mesoderm (Fig. 3). Expression of the DDX4 protein was localized in the PGCs cytoplasm, indicating that at this stage, PGCs appear to be in the process of migrating laterally and dorsally out of the epithelium of the posterior intestine, while some PGCs are still immersed in the primitive intestinal epithelium (Fig. 3D). From St13, characterized by the presence of 30 pairs of somites and, where for the first time limb buds appear, the establishment of the undifferentiated gonad is evident because of a condensation of somatic cells that envelop the PGCs and which are surrounded by a growing coelomic epithelium (Fig. 4). At this stage, PGCs continue to migrate through the intestinal mesentery to the gonadal region (Fig. 4A and B), where they appear to accumulate in the coelomic epithelium of the developing gonad (Fig. 4C and D). The gonad remained undifferentiated, thus it appeared to be morphologically identical in both XY and XX embryos.

3.4. Beginning of morphological differentiation of the gonad

The onset of morphological differentiation in the *Sturnira lilium* gonad was observed from St17 of embryonic development (Fig. 5). At this stage, limbs are no longer just buds and the formation of digits through the interdigital membrane can be observed. In XX embryos, no significant morphological changes were observed, only certain growth in the gonad. However, in XY embryos, it was evident the testicular cords formation by migrating cells from the gonad surface. These cells give rise to *Sox9* positive cells becoming pre-Sertoli cells and interstitial cells. The testis cords, formed by pre-Sertoli and PGCs, become surrounded by the basement membrane separating them from the interstitium where we can observe blood vessels and cells that make up the stromal compartment. (Fig. 5). The formation of the testicular cords, formed by pre-Sertoli and PGCs was indicated by the immunodetection of proteins for the *Sox9* and *Mis* genes, which were expressed in the nucleus and cytoplasm, respectively, of the Sertoli cells (Fig. 5A and B) and DDX4 in the PGCs cytoplasm. During these morphogenetic changes, PGCs begin to appear within the testicular cords, interacting with somatic cells (Fig. 5C and D).

3.5. Testicular differentiation

At stage 18, tissue is no longer apparent between the first and second digits, leaving the thumb free from the rest of the hand plate, whereas the chiropractic is observed to be thinner among the rest of the digits (Fig. 1). Here, in the XY embryos, the testicular cords continue to be transferred to the medullary region of the gonad, so that by St19, these have already completely separated from the gonad surface (Fig. 6). The cords that are nearer to the medullary region are longer, whereas towards the cortical region they are fragmented and more circular (Fig. 6E and F). The incorporation of the PGCs into the testicular cords was indicated by them expressing the DDX4 protein (Fig. 6C and D). Analyzing PGCs at a higher resolution, we observed that these are within the testicular cords, presenting a morphology that is characteristic of a cell in mitotic arrest, meaning that they present with a nucleus where the chromatin is homogeneously distributed. This diffuse distribution of chromatin in the nucleus of PGCs suggests that the proliferation of this lineage has ceased and may now be termed spermatogonia (Fig. 6G and H). Fragmentation of the testicular cords was also indicated by the expression of proteins for *Sox9* and *Mis* genes,

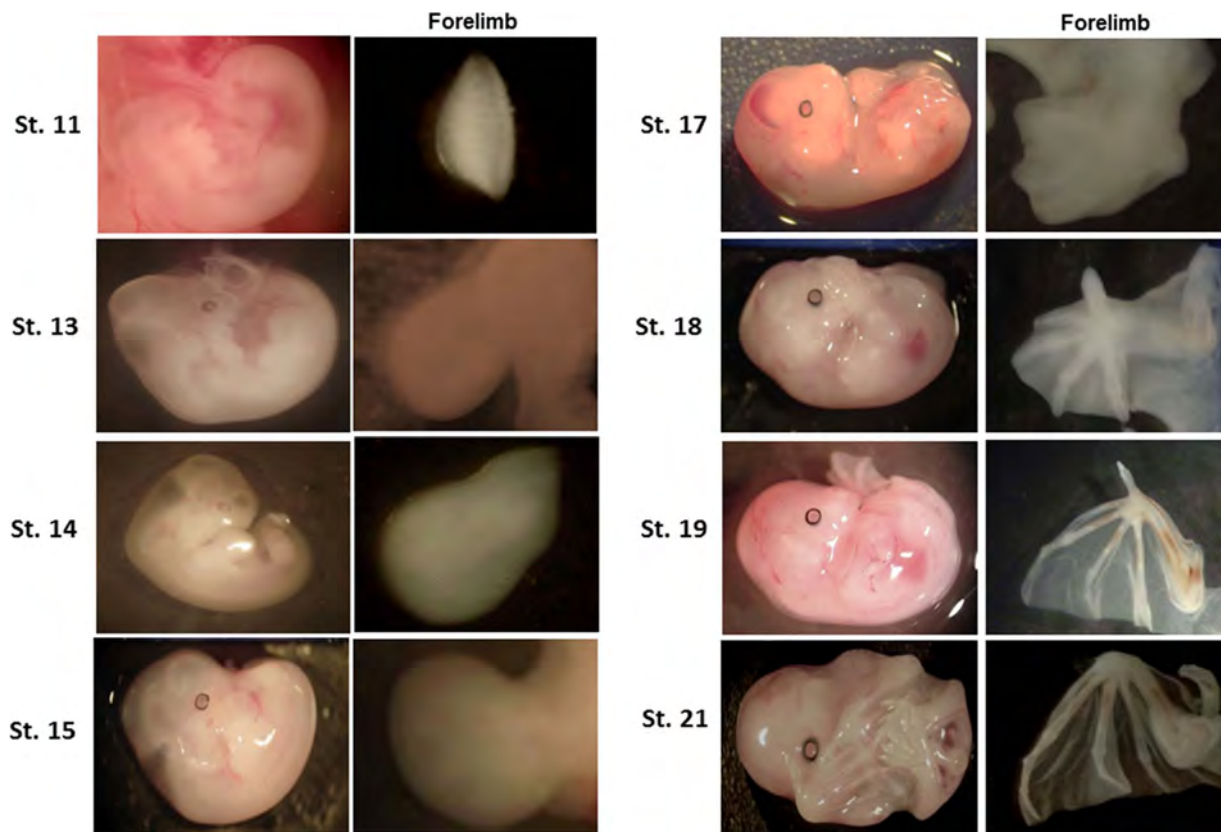


Fig. 1. Principal stages in the embryonic development of *Sturnira lilium* related to the most relevant events of gonadal morphogenesis and its correlation with the morphological development of the anterior limbs: St11 migration of PGCs through the dorsal mesentery; St13–St15 establishment of the undifferentiated gonad; St17 beginning of morphological differentiation of the gonad; and St18–St21 ovarian and testicular differentiation.

which characterize the Sertoli cells and were mainly located at the periphery of the testicular cords (Fig. 6A and B).

3.6. Ovarian differentiation

At St18 of embryonic development in *Sturnira lilium*, it is already possible to morphologically distinguish an ovary from a testicle. Analyzing ovarian development at St19, where the thumb and all digits of the hind limbs are observed with primordial claws at the tip (Fig. 7) at the level of clear field microscopy, the ovary appears to show no changes with respect to the structure of the undifferentiated gonad; only certain growth can be observed, probably due to the proliferation of both somatic and PGCs cells (Fig. 7A and C). However, using electron microscopy at a higher resolution, we observed that primordial germ cells present with a nucleus where chromatin appears condensed, forming chromosome-like structures (Fig. 7E). Further enhancing the

resolution, it was apparent that PGCs with chromatin condensation exhibited synaptic complexes, suggesting that these cells have initiated meiosis (Fig. 7F and G). These germ cells, now known as oocytes, are grouped within cords, and in some cases, are already interacting with somatic cells (Fig. 7G and H).

3.7. Western blot

SOX9, MIS and DDX4 proteins were detected by western blot analysis of homogenates of adult bat testicular which was in agreement with our immunofluorescence data (Fig. 8). The proteins detected had an estimated molecular mass reported for each of the proteins SOX9 (60 kDa), MIS (60 kDa) and DDX4 (76 kDa).

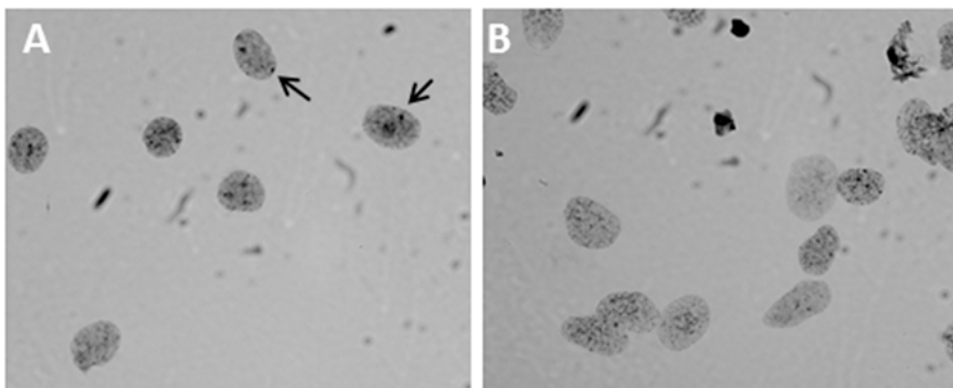


Fig. 2. (A and B) Determination of chromosomal sex in *Sturnira lilium* embryos by the presence or absence of the Barr corpuscle. (A) Nuclei of amniotic cells corresponding to chromosomal sex XX, where the presence of the Barr corpuscle is observed at the periphery (arrows). (B) Amniotic nuclei with absence of the Barr corpuscle corresponding to an XY chromosomal constitution.

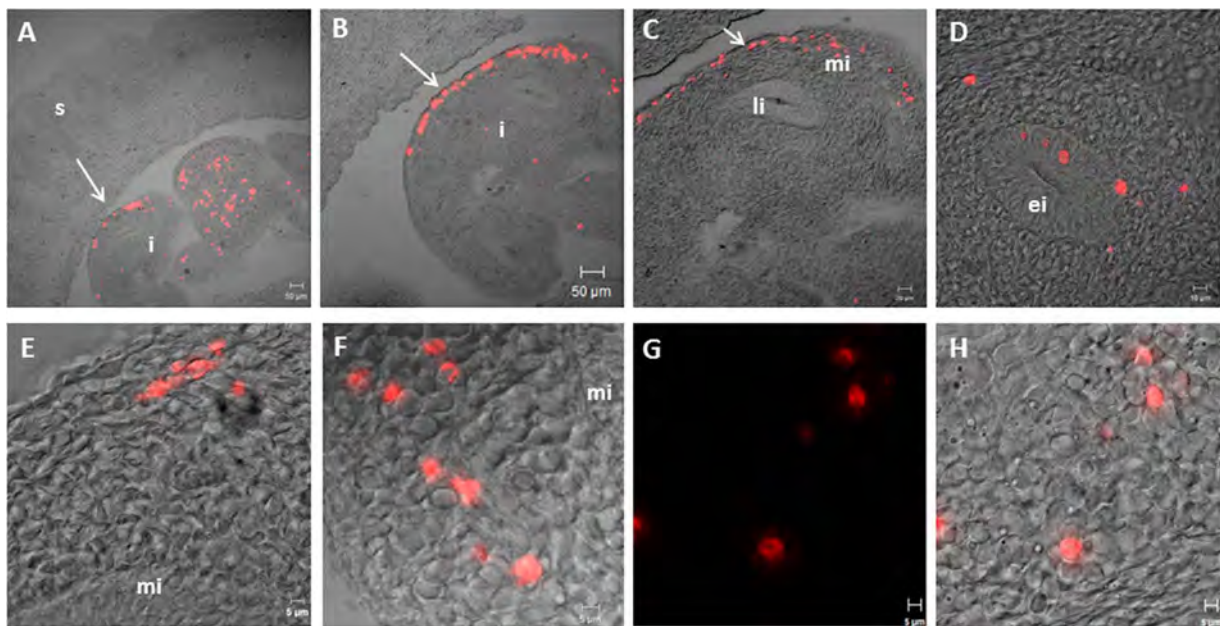


Fig. 3. Confocal and Nomarski microscopy at St11 in a *Sturnira lilium* embryo. Detection of PGCs by expression of the protein for *Ddx4* gene. (A) Longitudinal section of the embryo where the somites (s) and intestine in formation (i) can be observed. (B) DDX4 positive PGCs located in the intestinal endoderm (arrow). (C) Amplification of the intestinal region where the lumen of the intestine (li) is apparent, with PGCs located in the intestinal endoderm (arrow). (D–H) Amplification of PGCs where the expression pattern of the protein for the *Ddx4* gene localized in the PGCs cytoplasm (red) is observed in the intestinal mesentery (mi). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

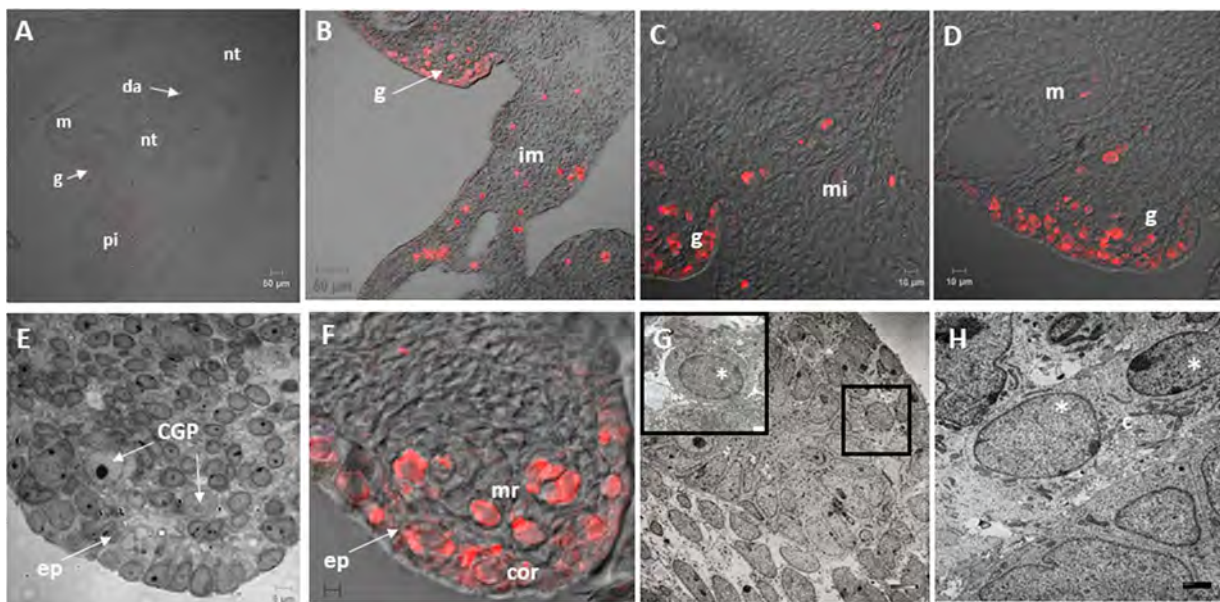


Fig. 4. Establishment of the undifferentiated gonad in embryos of *Sturnira lilium* at St13. (A) Transverse section of the caudal region of an embryo, where the neural tube (nt), the dorsal aorta (da), the notochord (nt), the region of the gonad (g) adjacent to the mesonephric region (m) and the developing posterior intestine (pi) can be observed. Migrating PGCs can be observed in red. (B) Amplification of the region of the intestinal mesenterium (im) where the PGCs can be observed both in migration (red) and colonizing the gonadal region (g). (C) Part of the gonadal region (g) and intestinal mesenterium (im) that makes it possible to observe the migration and colonization of the gonad by the PGCs. (D) Gonadal region (g) colonized by PGCs (red) and bound to the mesonephric region (m). (E) Transverse section at the level of clear field microscopy of the gonadal region, where PGCs can be observed in the medullary region that is surrounded by coelomic epithelium (ep). (F) The protein for the *Ddx4* gene is located in the cytoplasm of the PGCs (red) and can be seen both in the medullary region (mr) and the cortex (cor) of the undifferentiated gonad. (G–H) Transmission electron microscopy of the intestinal region of the embryo at St13. PGCs can be observed in the migration phase, evidenced by the presence of a round and prominent nucleus (*) and the extension of its cytoplasm (c). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion

Comparative studies of embryonic development among mammalian species that exceed classical laboratory models are necessary for increasing the understanding of cellular, physiological and molecular aspects related to the biology of vertebrate development. Within this

context, mechanisms of sexual determination and differentiation, as well as the establishment of the germ line in the gonad, have been extensively studied in some mammals such as the human, mouse and rat; revealing few differences in these processes. Thus, it is relevant to identify these aspects of sexual differentiation in other species of mammals, especially in wild fauna, where knowledge is practically non-

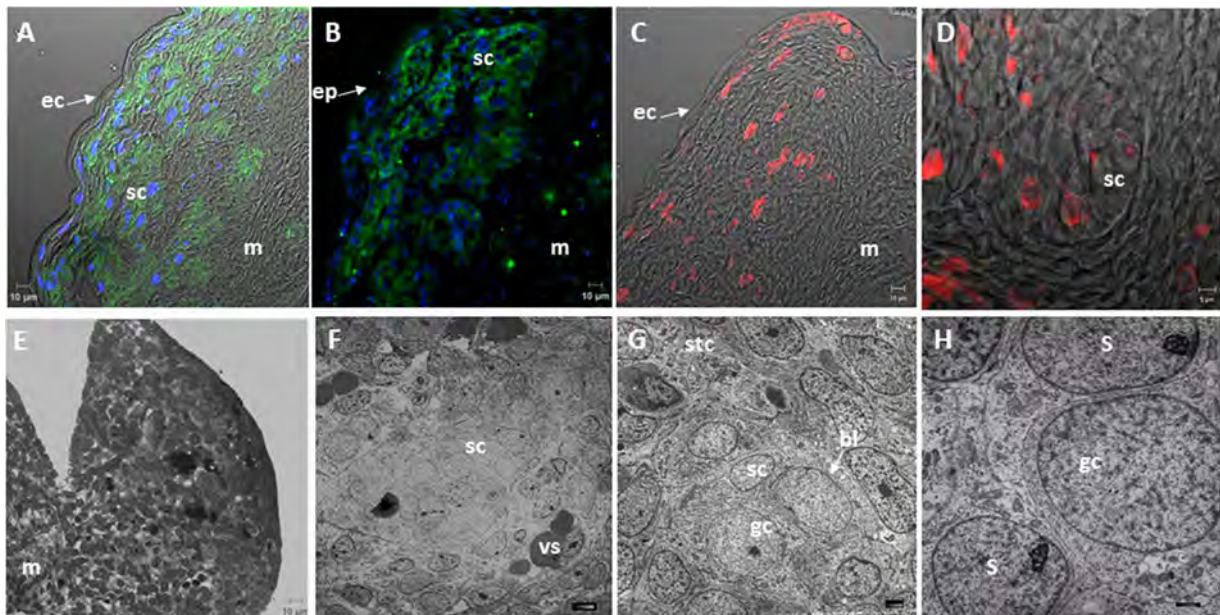


Fig. 5. Beginning of the morphological differentiation of the gonad in *Sturnira lilium* at St17. (A) Detection of the SOX9 protein (blue) and MIS protein (green) genes combined with or without Nomarski light (B), where initiation of the of the seminiferous cords formation (sc) (ep) is apparent. Mesonephros (m). (C) Expression of the *Ddx4* gene, making it possible to observe the location pattern of the germinal line (red) in the gonad. (D) At a higher resolution of (C), the DDX4 protein is located in the cytoplasm of germ cells (red), which are incorporated into the seminiferous cords (sc). (E) At the level of light field microscopy, the degree of differentiation of the male gonad at St17 was corroborated. (F-H) At the electron microscopy level, seminiferous cords (sc) formed by germ cells (gc) and Sertoli (S) cells, and delimited by a basal lamina (bl) were observed. Blood vessels were located outside the cords and cells that make up the stromal compartment (stc). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

existent. The present work therefore represents a study where the main stages of gonadal development and the morphological differentiation of ovaries and testes in Chiroptera are described for the first time at a morphological level, using the phyllostomid bat *Sturnira lilium* as a model.

It is apparent that different species of chiroptera have acquired different strategies of reproduction during their evolution, according to the locations they inhabit. However, although different bat species face

different environmental adaptations, some processes involved in the physiological functions of their reproductive organs, such as their reproductive patterns, are similar to other mammals and have a closer resemblance to humans than rodents (Campos-Sánchez et al., 2014). In this respect, considering the reproductive strategies of bats, it is not possible to cite a typical breeding pattern because different species face variable environmental conditions; so, they have developed different morphological adaptations and even novel reproductive behaviors

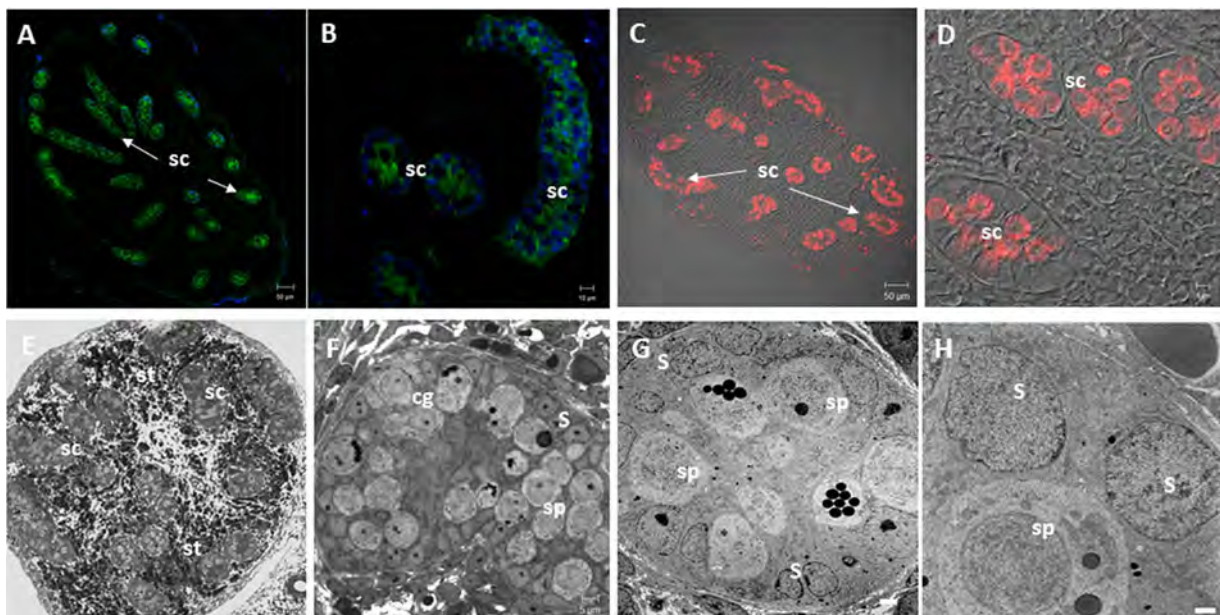


Fig. 6. Morphological differentiation of the testis of *Sturnira lilium*. (A-B) Detection of the protein for Sox9 gene (blue) in the nucleus and MIS (green) in the cytoplasm of Sertoli cells in the testis of *S. lilium* at St19. (C-D) Expression of the DDX4 protein in the cytoplasm of spermatogonia (red) located within the seminiferous cords (sc). (E) Clear field microscopy of the *S. lilium* testis at St19 where the seminiferous cords (sc) surrounded by stromal tissue (st) are observed. (F) At a higher resolution, the seminiferous cords formed by spermatogonia (sp) and Sertoli (S) cells can be observed, corroborated by transmission electron microscopy (G). (H) The nucleus of the spermatogonia (sp) present homogeneously distributed chromatin. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

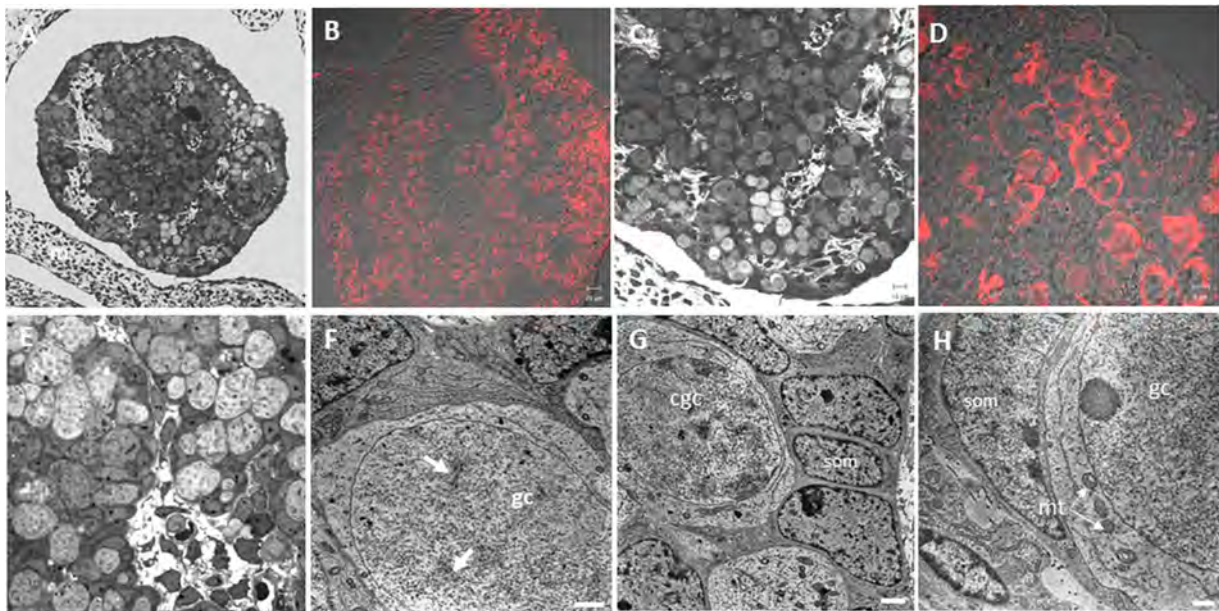


Fig. 7. Morphological differentiation of *Sturnira lilium* ovaries. Clear field microscopy (A and C) and detection of the expression of the protein for the *Ddx4* gene (B–E) in the ovary at St19, where a large number of germ cells can be observed. (F and G) At the level of electron microscopy, it was observed that germ cells (gc) had initiated meiosis because of the presence of synaptonemal complexes (arrows in F). (H) Interaction of oocytes with somatic cells (som), indicating the onset of folliculogenesis. The presence of the mitochondria of tubular ridges in the oocyte cytoplasm (mt) is also evident.

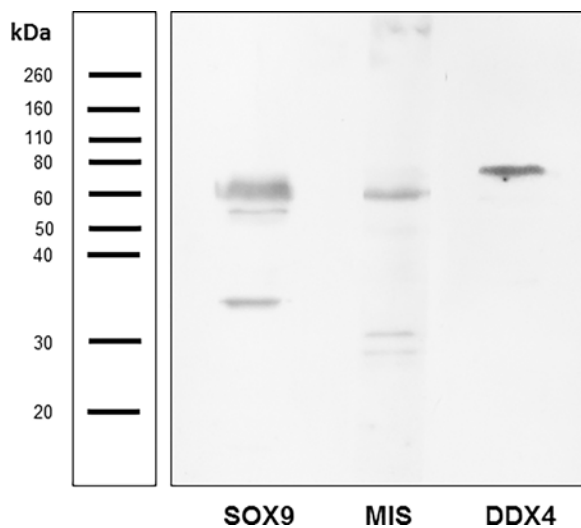


Fig. 8. Validation by western blot of the primary antibodies in homogenized adult bat testicular *Sturnira lilium*. Bands were identified corresponding to the weight reported for each of the proteins SOX9 (60 kDa), MIS (60 kDa) and DDX4 (76 kDa).

(Rasweiler, 1993). In the particular case of *Sturnira lilium*, it has a simple tubular uterus and a bimodal polyestrous reproductive pattern, producing offspring only twice a year. Likewise, only one offspring, or occasionally two, is born. The reproductive tract of females, like other mammals, consists of two ovaries, two oviducts, and a uterus, cervix and vagina. However, within this traditional scheme, various anatomical and physiological adaptations are possible (Wimsatt, 1975, 1979). The functionality of ovaries is variable in bats, and although most have ovarian activity in both ovaries, some species may ovulate consistently from one ovary, meaning that the functional ovary is usually larger (Rasweiler and Badwaik, 2000; Antonio-Rubio et al., 2013).

Similarities from a comparison between bats, humans and rodents can contribute to knowledge within the field of gonadal sexual determination and differentiation. One of the main questions in this context concerns the physiology of primordial germ cells (PGCs), which

has been extensively studied in laboratory models covering the five groups of vertebrates, with differences mainly observed in their migratory behavior, time taken for colonization of the gonads and sexual differentiation towards oocytes or spermatogonia, among the different groups (De Felici, 2016). In the case of the *S. lilium* bat, and as in most mammals, we observed that the PGCs in the early stages of development (stages 11–17) have migratory characteristics due to their extra-embryonic origin that conditions them to be carried along passively, or to use their own locomotion capacity to reach the genital ridges. Like the mouse, the rat, the rabbit and the human; PGCs migrate in formation through the intestinal mesentery towards the gonadal ridges, and express the protein for the *Ddx4* gene, characteristic of the germ line in vertebrates and invertebrates (Tanaka et al., 2000; Wessel, 2016).

Although the present study does not describe all the stages of embryonic development in *Sturnira lilium*, following the stages described by Cretekos et al. (2005) for the *Carollia perspicillata* bat, we were able to describe the main morphological events related to the establishment of the undifferentiated gonad and their differentiation into a testicle or an ovary and to correlate these events with embryonic development. We observed the establishment of an undifferentiated gonad in St13 and St14; in St11, despite the presence of PGCs in migration, the formation of a genital ridge was not yet found. These data suggest that the formation of the undifferentiated gonad and its colonization by the PGCs occurs between stages 13 and 16 of embryonic development in *Sturnira lilium*. As mentioned, there are no reports on gonadal development in bats; however, morphological changes and the migration mechanism of PGCs closely resemble those described for other mammals (Ottolenghi et al., 2006; Eggers et al., 2014; Carré and Greenfield, 2016).

As during gonadal morphogenesis in rodents and primates, the onset of morphological differentiation of the gonad occurs in XY individuals. In *S. lilium*, this process begins at St17 and is also due to the formation of the testicular cords (Pelliniemi and Frojzman, 2001). The differentiation of the Sertoli cell lineage also occurs in the testes of *S. lilium*, as the expression of the autosomal *Sox9* and *Mis* genes was detected in the nucleus and cytoplasm of Sertoli cells, respectively, as has been reported for rodents (Josso et al., 1998; Moreno-Mendoza et al., 2003). In the case of the ovary, at the same stage of development when the

onset of testicular differentiation is observed, there is no sign of changes with respect to the undifferentiated gonad structure, it may only have increased in size due to the increase in the number of germinal cells. These findings suggest that the mechanisms of sex determination and differentiation are similar to those described in model organisms, such as the mouse and rat, as well as in humans and other primates (She and Yang, 2014). This proposal is corroborated by the fact that as embryonic development progresses, the fragmentation of the testicular cords and cessation of proliferation of the germinal line are observed in the testicles of *S. lilium*, whereas in the ovaries, the germ cells perform a physiological differentiation at the onset of the process of meiosis.

According to our findings, we can argue to date that some mechanisms related to the determination and sexual differentiation in rodents and humans are similar in Chiroptera. However, differences can in fact be established during the time that these processes are taking place. We can also indicate that the correlation between the development of the limbs and gonadal development is a good parameter for establishing morphological changes in the gonads of bats. In this regard, it has been suggested that the relative synchronization and positioning during the initial formation of the anterior limb buds seems to continue in the bat and the mouse and that differences in limbs in adults arise from differences in morphogenesis during embryonic development (Cretekos et al., 2008). It is also known that in the mouse, between 7.5 and 9.5 days postcoitum (dpc), PGCs migrate from the primitive streak to the posterior endoderm (developing intestine), whereas in *S. lilium* these same events are observed between stages 11 and 15; however, the morphology of the limb buds is very similar in both species. At 10.5 dpc in the mouse, the PGCs colonize the gonads, accumulating in the basal membrane and are grouped both with each other and with populations of somatic cells. These gonadal morphogenesis events coincide with PGCs colonization events at stages 13 and 14 in *S. lilium*. In both species of mammals, the buds of the anterior limbs appear larger, but there is still no evidence of digits. At 12.0 dpc, the onset of male gonadal sexual differentiation in the mouse is evident, demonstrated by the initiation of the formation of the testicular cords, after which a testicle containing testicular cords is established; meanwhile, the females present clusters of small and irregularly shaped cells (Buehr et al., 1993; Anderson et al., 2000). During these stages of ovarian and testicular differentiation, the limbs in both species of mammals begin to present distinctive features. While the anterior limbs of the mouse have an angular shape and digit marks are barely visible (Behringer et al., 2013), in *S. lilium*, the thumb has begun to separate from the second digit. Therefore, from a comparative point of view, the main events of gonadal development leading to the formation of ovaries and testicles, and their correlation with limb differentiation are similar in the bat and the mouse. This means that the morphological characteristics of the development of the bud of the anterior limbs are similar between the two species in terms of when the undifferentiated gonad is established and morphological differentiation initiation. This similarity corroborates the fact that the early events of embryonic development are similar among mammalian vertebrates, and particularly in this case, among mammals with homologous structures such as limbs and reproductive organs.

5. Conclusion

The purpose of this study was to analyze the gonadal morphogenesis and establishment of the germline in the phyllostomid bat *Sturnira lilium*. Our results indicate that the early gonadal development, migration of the PGCs and testicular and ovarian differentiation in *S. lilium* are similar to those described in mice. Also, genes expression as *Sox9*, *Mis* and *Ddx4* are conserved and it is suggested that they have a similar function during gonad development among mammals.

Conflict of interests

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments


Tania Janeth Porras-Gómez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 513380/290144 from CONACYT. We thank Biol. Exp. Gónzalo Acero for technical assistance in western blot protocol. This work was supported by the UNAM-DGAPA-PAPIIT IN205515.

References

- Anderson, A., Copeland, T.K., Choler, H., Heasman, J., Eylie, C., 2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech. Dev.* 91, 61–68.
- Antonio-Rubio, N.R., Porras-Gómez, T.J., Moreno-Mendoza, N., 2013. Identification of cortical germ cells in adult ovaries from three phyllostomid bats: *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 825–836. <http://dx.doi.org/10.1071/RD12126>.
- Arita, H., Ceballos, G., 1997. Los mamíferos de México: distribución y estado de conservación: revista Mexicana de Mastozoología Ed. Galemys 2, 33–71.
- Baker, R.J., Novacek, M.J., Simmons, N.B., 1991. On the monophyly of bats. *Syst. Zool.* 40, 216–231.
- Balmori, A., 1999. Lareproducción en los quirópteros. Revisión en Mastozoología Ed. Galemys 11, 17–34.
- Behringer, R., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Nagy, A., et al., 2013. Isolation, culture and manipulation of postimplantation embryos. In: Behringer, R. (Ed.), *Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual*, vol. 5. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 149–156.
- Buehr, M., Subin, G.U., McLaren, A., 1993. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117, 273–281.
- Bullejos, M., Sánchez, A., Burgos, M., Jiménez, R., Díaz De La Guardia, R., 2000. The SRY gene HMG-box in micro- and megabats. *Cytogenet. Cells Genet.* 88, 30–34.
- Campos-Sánchez, R., Kapusta, A., Feschotte, C., Chiaromonte, F., Makova, K.D., 2014. Genomic landscape of human, bat and ex vivo DNA transposon integrations. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1816–1832.
- Carré, G.A., Greenfield, A., 2016. The gonadal supporting cell lineage and mammalian sex determination: the differentiation of sertoli and granulosa cells. *Results Probl. Cell Differ.* 58, 47–66.
- Cretekos, C.J., Weatherbee, S.D., Chen, C.H., Badwaik, N.K., Niswander, L., Behringer, R.R., Rasweiler 4th, J.J., 2005. Embryonic staging system for the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata*, a model organism for the mammalian order Chiroptera, based upon timed pregnancies in captive-bred animals. *Dev. Dyn.* 233, 721–738.
- Cretekos, C.J., Wang, Y., Green, E.D., NISC Comparative Sequencing Program, Martin, J.F., Rasweiler 4th, J.J., Behringer, R.R., 2008. Regulatory divergence modifies limb length between mammals. *Genes Dev.* 22, 141–151. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1620408>.
- De Felici, M., 2016. The formation and migration of primordial germ cells in mouse and man. *Results Probl. Cell Differ.* 58, 23–46. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_2.
- Donahoe, P.K., Ito, Y., Price, J.M., Hendren 3rd, W.H., 1977. Müllerian inhibiting substance activity in bovine fetal, newborn and prepubertal testes. *Biol. Reprod.* 16, 238–243.
- Dwyer, P.D., 1966. The population pattern of *miniopterus schreibersii* (Chiroptera) in north-east new south wales. *Aust. J. Zool.* 14, 1073–1137. <http://dx.doi.org/10.1071/ZO9661073>.
- Eggers, S., Ohnesorg, T., Sinclair, A., 2014. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 673–683. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.163.1-11>.
- Fleming, T.H., Hooper, E.T., Wilson, D.E., 1972. Three Central American communities: structure, reproductive cycles and movements patterns. *Ecology* 53, 555–569.
- Gannon, M., Willing, M., Jones Jr., J., 1989. *Sturnira lilium*. *Am. Soc. Mammal.* 333, 1–5.
- Green, R.H., 1966. Notes on lesser long-eared bat, *Nyctophilus Geoffroyi* in northern Tasmania. *Launceston. Queen Victoria Museum* 22, 1–4.
- Grzimek, B., 1990. Bats. In: Grzimek, B. (Ed.), *Grzimek's Encyclopedia of Mammals 1* (2. McGraw-Hill Publishing Co., New York, pp. 584–611).
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245–250.
- IUCN. , International Union for Conservation of Nature. Red List of Threatened Species, 2012. Available at www.iucnredlist.org.
- Josso, N., Racine, C., di Clemente, N., Rev, R., Xavier, F., 1998. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 3–7.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27, 8A–137.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117–121.
- Kurta, A., Kunz, T., 1987. Size of bats at birth and maternal investment during pregnancy. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 57, 79–106.
- McKean, J.L., Hamilton-Smith, E., 1967. Litter size and maternity sites in Australian bats (Chiroptera). *Vic. Nat.* 84, 203–206.
- Medellín, R.A., Arita, H.T., Sánchez, O., 2008. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Instituto de Ecología, UNAM Press, México.

- Mello, M.A.R., Kalko, E.K.V., Silva, W.R., 2008. Diet and abundance of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian montane atlantic forest. *J. Mammal.* 89, 485–492. <http://dx.doi.org/10.1644/06-MAMM-A-11R.1>.
- 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-Mendoza, N., Harley, V., Merchant-Larios, H., 2003. Cell aggregation precedes the onset of Sox9-expressing preSertoli cells in the genital ridge of mouse. *Cytogenet. Genome Res.* 101, 219–223.
- Moreno-Mendoza, N., Torres-Maldonado, L., Chimal-Monroy, J., Harley, V., Merchant-Larios, H., 2004. Disturbed expression of Sox9 in pre-sertoli cells underlies sex-reversal in mice b6. *Yttr. Biol. Reprod.* 70, 114–122.
- National Research Council., Guide for Care and use of Laboratory Animals, Bethesda: Institute for Laboratory Animals Research (ILAR) of the National Academy of Sciences, 1996.
- Nowak, R.M., 1999. *Walker's Mammals of the World*, 6th edition. John Hopkins University Press, Baltimore, USA.
- Ottolenghi, C., Uda, M., Crisponi, L., Omari, S., Cao, A., Forabosco, A., Schlessinger, D., 2006. Determination and stability of sex. *Bioessays* 29, 15–25.
- Palmer, S.J., Burgoyne, P.S., 1991. The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex-reversal in C57BL/6-YPOS mice. *Development* 113, 709–714.
- Pelliniemi, L.J., Frojzman, K., 2001. Structural and regulatory macromolecules in sex differentiation of gonads. *J. Exp. Zool.* 290, 523–528.
- Phillips, W.R., Inwards, S.J., 1985. The annual activity and breeding cycles of Gould's long-eared bat, *Nyctophilus gouldi* (Microchiroptera: Vespertilionidae). *Aust. J. Zool.* 33, 111–126.
- Rasweiler 4th, J.J., Badwaik, N.K., 2000. Anatomy and physiology of the female tract. In: Crichton, E.G., Krutzsch, P.H. (Eds.), *Reproductive Biology of Bats*. Academic Press, London, pp. 157–219.
- Rasweiler 4th, J.J., 1993. Pregnancy in chiroptera. *J. Exp. Zool.* 266, 495–513.
- Ryan, R.M., 1963. *Life History and Ecology of the Australian Lesser Long-eared Bat, Nyctophilus Geoffroyi* (Leach). University of Melbourne, Melbourne (Unpublished MSc Thesis).
- She, Z.Y., Yang, W.X., 2014. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *J. Mol. Endocrinol.* 53, R21–37. <http://dx.doi.org/10.5030/JME14-0018>.
- Simmons, N.B., Conway, T., 2001. Phylogenetic relationships of mormoopid bats (Chiroptera, Mormoopidae) based on morphological data. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 258, 1–97.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–244.
- Stoner, K.E., 2001. Differential habitat use and reproductive patterns of frugivorous bats in tropical dry forest of northwestern Costa Rica. *Can. J. Zool.* 79, 1626–1634.
- Svingen, T., Koopman, P., 2013. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27, 2409–2426. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.228080.113>.
- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokayama, M., Noce, T., 2000. The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14, 841–853.
- Volleth, M., Heller, K.G., Pfeiffer, R.A., Hameister, H., 2002. A comparative ZOO-FISH analysis in bats elucidates the phylogenetic relationships between Megachiroptera and five microchiropteran families. *Chromosome Res.* 10, 477–497.
- Wessel, O.M., 2016. Germ line mechanics and unfinished business. *Curr. Top. Dev. Biol.* 117, 553–566. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.030>.
- Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M.J., Combes, A.N., Beverdam, A., Bowles, J., Mizusaki, H., Koopman, P., 2005. Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* 287, 111–124.
- Wimsatt, W.A., 1975. Some comparative aspects of implantation. *Biol. Reprod.* 12, 1–40.
- Wimsatt, W.A., 1979. Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *J. Reprod. Fertil.* 56, 345–357.
- Zhao, L., Koopman, P., 2012. SRY protein function in sex determination: thinking outside the box. *Chromosome Res.* 20, 153–162. <http://dx.doi.org/10.1007/s10577-011-9256-x>.

Expression of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*

Adriana Martínez-Juárez¹ | Marco A. López-Luna² | Tania J. Porras-Gómez¹ | Norma Moreno-Mendoza¹ 

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico, Mexico

²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, Mexico, Mexico

Correspondence

Norma Moreno-Mendoza, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228 México, D.F. 04510 México, Mexico.

Email: angelica@biomedicas.unam.mx

Funding Information

Grant sponsor: UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN205515; Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 288797/254969.

Abstract

The *Sox9* gene is important for determining sex in vertebrates, as well as for maintaining testis morphology and fertility during adult life. In the same way, *Vasa* is an important gene for the maintenance of the germinal lineage and has been highly conserved throughout evolution, as it is expressed in germ cells of both vertebrates and invertebrates. In the particular case of crocodiles, the expression of *Sox9* during gonadal morphogenesis and in the testes of 3-month-old *Alligator mississippiensis* has been studied. However, it is interesting to carry out studies on other species of crocodiles in relation to their particular mechanism for sex determination influenced by temperature. In this work, we investigated the expression of the *Sox9*, *Vasa*, *Foxl2*, and *TRPV4* genes in the ovaries and testes of 5-year-old juvenile crocodiles from *Crocodylus moreletii*. As expected, *Sox9* expression was found in males, but surprisingly, it was also found in females. For the first time, the expression of *Vasa* was reported in spermatogonia, oogonia, and oocytes of 5-year-old crocodiles. *Foxl2* is important for the development and maintenance of the ovary during adult life in vertebrates; moreover, *Foxl2* protein and transcripts are both highly expressed in the ovaries compared to the testes. A possible upstream regulator of the *Sox9* gene in reptiles has not yet been discovered; as such, the expression of the *TRPV4* ion channel was evaluated. The *TRPV4* ion channel was expressed in the cytoplasm of Sertoli and follicular cells and was therefore proposed as a possible regulator of *SOX9*.

KEYWORDS

crocodile, ovary, *Sox9*, temperature-dependent sex determination, testes, *TRPV4*

1 | INTRODUCTION

The *SOX9* transcription factor has been highly conserved throughout the evolution of vertebrates, including reptiles (Nagai, 2001; Soullier et al., 1999). *SOX9* is a member of the *SOX* family of transcription factors and has a high mobility group-boxDNA-binding domain and two transactivation domains (Harley, Clarkson, & Argentaro, 2003). It is expressed in the nuclei of Sertoli cells after 11.5 days of embryonic development of mouse and is necessary for the differentiation of this cell lineage, as well as for the formation of the seminiferous tubules in morphogenesis of the testis. *SOX9* also directly interacts with the steroidogenic factor type 1 to induce anti-Müllerian hormone expression and promote the regression of Müllerian ducts during morphogenesis of the male reproductive tract (De Santa Barbara et al., 1998; She et al., 2014). In mouse, *SOX9* expression and function have been widely characterized during the fetal (She et al., 2014) and adult (Qin

et al., 2005) stage. In particular, *SOX9* expression in sexual determination during early embryogenesis has also been described for turtles, such as *Lepidochelys olivacea* and *Trachemys scripta*, and for the alligator, *Alligator mississippiensis* (Moreno-Mendoza, Harley, & Merchant-Larios, 1999; Shoemaker-Daly, Jackson, Yatsu, Matsumoto, and Crews, 2010; Western, Harry, Graves, & Sinclair, 1999). However, it is still unclear how *SOX9* involvement in the post-hatching and adult stages is regulated, as reptiles with temperature-dependent sex determination (TSD) lack the *SRY* gene, which is an upstream regulator of *SOX9* in mammals (Coriant, Valleley, Ferguson, & Sharpe, 1994).

The testicles of crocodiles were described for the first time by Hans Sloane, in 1725, and in alligators (*A. mississippiensis*) from Louisiana, and since then, little work on their morphology has been undertaken (Gribbins et al., 2010; Lance, 1989; Moore et al., 2010). During reproduction, it has been observed that testicular mass increases in size and spermatogenesis initiates, and live spermatozoa are found in the sulcus

of the penis. The testicles are located in the upper part of the abdominal cavity that is covered by the tunica albuginea, and the seminiferous tubules are found in the parenchyma, which consists of germline cells at different stages, for example, spermatogonia, spermatocytes, spermatids, and spermatozoa (Gribbins et al., 2010; Lance, 1989; Moore et al., 2010). In mouse and other vertebrates, it is known that these cell types express the ATP-dependent RNA helicase VASA (Fujiwara et al., 1994; Tanaka et al., 2000). This protein is used as a specific marker of the germline at the fetal and adult stages. Adjacent to these germline cells are the Sertoli cells; in adult mice, Sertoli cells express the *Sox9* gene, which maintains the morphology and fertility of the testis (França, Hess, Dufour, Hofmann, & Griswold, 2016; Qin et al., 2005). The seminiferous tubules are surrounded by connective tissue and Leydig cells, which are located in the interstitium and are responsible for the production of testosterone (Lance, 1989; Wen, Cheng, & Liu, 2016).

The *Sox9* gene can be synergistically and negatively regulated by two independent pathways: WNT4/RSPO1 and the transcription factor Forkhead box L2 (FOXL2), which allow the development of an ovary during embryogenesis (Uhlenhaut et al., 2009; She et al., 2014). In turn, in adult mice, the transcription factor FOXL2 prevents the transdifferentiation of granulosa cells into Sertoli cells thus making it a very important element for maintaining adult ovary morphology in several vertebrate species (Bertho et al., 2016; Uhlenhaut et al., 2009).

The crocodile ovary was first described by Dutta in 1949 in *C. palustris* and later by Joanen and McNease in 1980 in *A. mississippiensis* (Dutta, 1949-1953; Joanen et al., 1980). This organ is located in the dorsal wall of the peritoneum, and histologically, it is composed of two regions: the ovarian cortex and the marrow. The ovarian cortex contains oogonia and follicles at different stages, that is, previtellogenic, vitellogenic, luteal bodies, and atretic, that are classified on the basis of morphological and cytoplasmic characteristics (Uribe et al., 2000). Expression of the VASA protein has been reported at all stages of oogenesis in species such as *Xenopus laevis* and *Danio rerio* (Braat, Zandbergen, Van de Water, Goos, & Zivkovic, 1999; Komiya, Itoh, Ikenishi, & Furusawa, 1994). In the case of the mouse, the *Vasa* gene is expressed in germ cells and stem cells that are thought to possibly differentiate into oocytes (De Felicci, 2010). Follicular development in crocodiles involves the maturation and differentiation of granulosa cells; in mammals, the *Foxl2* gene plays an important role in this process and in maintaining fertility in the adult ovary (Uhlenhaut et al., 2009). The medullary portion of the ovary is formed from connective tissue with lacunae surrounding the follicles (Uribe et al., 2000).

It is important to mention that some specific physiological processes during spermatogenesis (Mizrak et al., 2008) and folliculogenesis (Teilmann et al., 2005) are regulated by ion channels from the Transient Receptor Potential (TRP) superfamily. TRPV4, a cationic channel that belongs to this family, is involved in the regulation of many homeostasis processes and is expressed in several types of tissues (Darby, Grace, Baratchi, & McIntyre, 2016). Likewise, the expression of TRPV4 mRNA has been observed in *A. mississippiensis* embryos during the temperature-sensitive period, when they are sexually determined (Yatsu et al., 2015, 2016). Thus, TRPV4 is considered to possibly play an important role in the regulation of testicular

morphology via upstream regulation of the activity of the transcription factor SOX9, as this has been demonstrated in other physiological processes, such as chondrogenesis (Muramatsu et al., 2007).

The regulation of *Sox9* gene expression, either positive in the testis or negative in the ovary of vertebrates, is fundamental to maintaining all the physiological processes of those tissues involved in reproduction. The aim of our work was therefore to characterize the expression of the *Sox9* and *Foxl2* genes as well as the TRPV4 ion channel in the ovaries and testicles of 5-year-old crocodiles using the RNA helicase VASA as a germline marker, correlating our results with the ultrastructure of these tissues. As expected, *Sox9* expression was found in males, but surprisingly, it was also found in females. For the first time, the expression of *Vasa* is reported in spermatogonia, oogonia, and oocytes of 5-year-old crocodiles. Both protein and transcripts of the *Foxl2* gene are highly expressed in the ovaries compared to the testes. A possible upstream regulator of the *Sox9* gene in reptiles has not yet been discovered; as such, the expression of the TRPV4 ion channel was evaluated. The TRPV4 ion channel was expressed on the membrane of Sertoli and follicular cells and is therefore proposed as a possible regulator of SOX9.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Tissue collection

Ovaries were obtained from two females and testicles were obtained from three males of *Crocodylus moreletii*, originating in Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco, México. These organisms were collected in May 2016 when the species was in breeding season. The SEMARNATSGPA/DGVS/05531/16 permits used were part of a programme to evaluate the reproductive biology of this species, as they are under special protection as an endangered species. Animals were sacrificed by injecting 5 ml of lidocaine into the brain. The ovaries and testes were then surgically removed and cut into several pieces. A fragment was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for immunofluorescence, and another fragment in Karnovsky's fixative to perform light and electron microscopy. Finally, other fragments were frozen prepared for total RNA extraction and Western blot analysis. Samples were transported to the Institute of Biomedical Research of the UNAM and processed as described in the following.

2.2 | Light and electron microscopy

Fragments of ovaries and testicles were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965) for 24 hr at 4°C and were then transferred into sodium cacodylate buffer (0.1 M pH 7.4) and stored for 24 hr at 4°C. Subsequently, gonads were post-fixed in osmium tetroxide (OsO₄; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 1 hr and dehydrated in 70%–100% ethanol solutions (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. of México, México). They were then placed in acetonitrile (J.T. Baker) twice for 20 min each and incubated in dilutions of the Embed 812 resin (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA)-acetonitrile (J.T. Baker) 1:1 for 1 hr and 2:1 for another hour. Finally, samples were incubated in pure Embed 812 resin

for 24 hr and polymerized in plastic blocks at 60°C for 24 hr. For each sample, semi-thin sections of 1- μm thickness and 60-nm thickness were obtained using a Leica ultramicrotome (Wetzlar, Germany). The semi-thin sections were stained with toluidine blue, mounted with Cytoseal mounting medium (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) and observed under a light microscope (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). The fine sections were placed on copper grids with a diameter of 3 mm, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed under a JEOL 1010 transmission electron microscope (JEM-1010; JEOL, Tokyo, Japan).

2.3 | Immunohistochemistry

Frozen samples were cut into 14- μm -thick sections and washed with 1 \times PBS for 10 min. Endogenous peroxidase was inactivated with 3% hydrogen peroxide (J.T. Baker) in methanol for 30 min. Sections were then washed with 1 \times PBS for 5 min and 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) was added for 10 min. Sections were then washed with 1 \times PBS, blocked with 1% albumin for 2 hr and incubated overnight with FOXL2 primary antibody (sc-68348; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) at a 1:50 dilution. The next day, sections were washed four times in 1 \times PBS for 5 min each. The Vector AB kit was used and sections were incubated with the anti-rabbit secondary antibody at a 1:100 dilution in 1% albumin (Sigma-Aldrich) for 1 hr at room temperature. Sections were washed four times in 1 \times PBS for 5 min each and then were placed in the AB reagent prepared following the Vector AB kit instructions (Vectastain ABC Kit, Burlingame, CA). Sections were washed again four times in 1 \times PBS for 5 min each and finally were developed with Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) for 4 min. Slides were allowed to dry at room temperature and were mounted using Cytoseal mounting medium.

2.4 | Immunofluorescence

Ovary and testis fragments were fixed in PFA (4% in 1 \times PBS pH 7.1) for 30 min, washed with 1 \times PBS for 5 min and placed in sucrose (30% PBS 1 \times pH 7.1, Sigma-Aldrich) at 4°C overnight. Samples were soaked in optimum mounting medium for frozen sections (OCT, Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA) and frozen in hexane (J.T. Baker) at -70°C. Subsequently, we obtained 20- μm sections in a cryostat (Leica GmbH, Heidelberg, Nussloch, Deutschland). Immunofluorescence was performed as previously described by Moreno-Mendoza et al. (1999). Briefly, sections were treated with Triton X-100 (1% in 1 \times PBS pH 7.1) for 10 min, washed with 1 \times PBS and blocked for 2 hr with 1% bovine serum albumin (BSA, 1% in 1 \times PBS pH 7.1). Sections were incubated separately with polyclonal antibodies against SOX9 (1:250, AB5535; Millipore, Burlington MA), TRPV4 (1:250, ab94868; Abcam, Cambridge, MA), VASA (1:50, ab13840; Abcam), and Laminin (1:200, rabbit ab11575; Abcam), diluted in 1% albumin, overnight at 4°C. They were then washed four times with 1 \times PBS for 5 min and incubated with antibodies against cyanine 3 (Cy3) (1:200, A10520; Life Technologies, Carlsbad, CA), Cy5 (1:100, A10523; Molecular Probes, Eugene, OR) and/or anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:50, 81611; Invitrogen, Carlsbad, CA) diluted in albumin/1 \times PBS for 1 hr at room

temperature. For the simultaneous detection of the SOX9-Laminin proteins, post-fixation with 4% PFA was performed for 15 min. Sections were then washed with 1 \times PBS, incubated with 1% Triton X-100 for 5 min, washed again with 1 \times PBS and blocked for 2 hr with 1% BSA. Subsequently, sections were then incubated with the anti-Laminin antibody, and the washes and secondary antibody incubations were repeated. Finally, permanent fluorescence assembly medium (Dako™, Carpinteria, CA) was added and samples were stored at 4°C for further analysis under a Zeiss confocal microscope (LSM Pascal; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) equipped with argon-krypton and helium-neon, employing filters for FITC and Cy3 and the Nomarski interference contrast technique.

2.5 | Detection of Δ^5 -3 β HSD activity

Fourteen-micron-thick sections were obtained from the tissues included in Tissue-Tek, and incubated at 37°C in histoenzymatic detection medium of Δ^5 -3 β HSD composed of 20 mg of β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD; N1636-250; Sigma-Aldrich), 20 mg of Nitro Blue Tetrazolium (N5514-10; Sigma-Aldrich) and 2 mg of dehydroisoandrosterone (D-4000; Sigma-Aldrich) for 1 hr. Sections were washed with distilled water and mounted in a permanent aqueous medium (Dako™) for observation under a light field microscope (Levy, Deane, & Rubin, 1959). As a positive control for the reaction, adult mouse testis sections of CD1 strain were used, where very specific Δ^5 -3 β HSD activity has resulted in Leydig cells.

2.6 | Amplification by RT-PCR

Total RNA extraction from ovaries and testes of *C. moreletii* was performed using the TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. The total RNA obtained was diluted in H₂O treated with diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma-Aldrich) and stored at -70°C. The concentration and purity of the samples were obtained using a UV light spectrophotometer (BioPhotometer; Eppendorf, Hamburg, Germany). To confirm the integrity of the samples, 1 μg of total RNA was run on a 1.5% agarose gel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) in 1 \times TAE solution (Tris-acetic acid-EDTA). To eliminate contamination with genomic DNA, 1 μg of RNA was treated with the enzyme DNase I (Invitrogen), following the protocol suggested by the manufacturer.

DNA coding synthesis (cDNA) was carried out using the M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen). The reaction mixture was prepared with 1 μg of total RNA, 4 μl of first-strand buffer (5 \times), 2 μl of dNTP mix (10 mM), 1 μl of random primers (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 μl of DTT (0.1 M), 1 μl of MgCl₂ (50 mM), 20 U RNase OUT™ and 200 U of M-MLV enzyme. The solution was incubated at 37°C for 60 min and at 65°C for 5 min in a MyCycler™ thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA). Amplification of specific fragments was performed with the Taq DNA Polymerase Recombinant Kit (Invitrogen). A volume of 4 μl of cDNA was used in a final volume of 20 μl of a mixture containing 9.7 μl H₂O DEPC, 2 μl Buffer (10 \times), 1 μl MgCl₂ (50 mM), 1 μl dNTPs mix (10 mM), 1.5 U Taq Polymerase and 1 μl of each specific oligonucleotide (20 μM). PCR conditions for all

TABLE 1 Sequence of Primers and Annealing Temperatures used for RT-PCR

Gene	Primer 5'→3'	AL (pb)	AT (°C)	Reference
Sox9	F: TACGACTACACGGACCACCA	400	60	AF106572
	R: ACCTCCTGAAGGCTGCTGTA			
Foxl2	F: TACTCSTACGTGGCCTSAT	251	60	Janes et al., 2013
	R: TTCTCGAACATGTCCTCGCAGG			
Vasa	F: GCAGTGATGTCCAGCAGAGT	218	60	XM_014594050
	R: CCGAAGAGCTTCTCCCGTT			
TRPV4	F: CTTCTCCAGCCCAAGGATG	299	60	Nagai et al., 2012
	R: GTCTTGGCAGCCATCATGAG			
Actin	F: GGGTCAGAAGAATTCCTATG	254	60	Moreno-Mendoza et al. (2004)
	R: GGTCTCAAACATGATCTGGG			

Sequences employed for RT-PCR. The amplification of actin was used as a positive control. F, forward sequence; R, reverse sequence; bp, base pairs of amplified fragment; AL, amplicon length; AT, annealing temperature.

fragments were as follows: 94°C for 5 min, 40 cycles at 94°C for 40 sec, 60°C for 40 sec, 72°C for 60 sec, and a 72°C extension cycle for 5 min in a MyCycler thermocycler (Bio-Rad Laboratories). The specific oligonucleotides used for amplification of fragments are listed in Table 1. mRNA sequences reported for *A. mississippiensis* and *Crocodylus palustris* were used for the design of oligonucleotides specific to SOX9 and VASA using the Primer BLAST programme (Ye, 2012). The oligonucleotides used for the amplification of the *FOXL2* gene were those reported by Janes, Elsey, Langan, Valenzuela, and Edwards, 2013. The sequence used for the oligonucleotides of the *TRPV4* gene was that reported by Nagai, Saitoh, Saito, and Tsutsumi, 2012. As a positive control, oligonucleotides were used for actin and negative reactions were performed without cDNA. The reaction products were run on a 1.3% agarose gel in 1 × TAE, viewed using a UV transilluminator (Vilber Lourmat, Torcy, France) and photographed for densitometry quantification.

2.7 | Densitometric analysis

Fragments corresponding to each gene were amplified in triplicate for each sample. The optical density (Intensity/mm²) for each band was quantified by densitometry using the Quantity One programme (Bio-Rad Laboratories). The optical density of each sample was normalized with respect to the corresponding actin values. The expression values for each gene are presented as arbitrary relative expression communities, obtained by the ratio of the gene of interest/actin for each sample. Relative expression values are presented as the means of independent experiments ± standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey multiple comparison test with a 95% confidence interval was performed, using the Statgraphics Centurion XV statistical programme.

2.8 | Sequencing of RT-PCR products

Bands corresponding to each gene were isolated from the agarose gel and purified following the protocol advised in the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). RT-PCR products were sequenced using the ABI 3730XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). The obtained sequences were analyzed with the BLASTN

programme 2.4.0 in order to obtain the percentage of similarity compared to sequences previously reported in GenBank. Sequences for the analyzed fragments were deposited in the GenBank with the following data: sox9, 400 pb, 495 aa, GenBank Accession No. NM_001287268.1; Foxl2, 251 pb, 307 aa, Gen Bank Accession No. XM_006258812.2; Vasa, 218 pb, 694 aa, Gen Bank Accession No. XM_014594053.1.

2.9 | Western blot analysis

We extracted total protein from the processed tissues and the samples were used for Western blot analysis of the Sox9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 proteins. For this, the tissues were gradually thawed from -20°C to 4°C and washed with 1 × PBS for 1 hr at each temperature. As the tissues were fixed in 4% PFA, lysis was performed by adding 250 μl of Tyroides-BSA at pH 7.3 (0.2% β-mercaptoethanol, 20 μl 100 nM orthovanadate, ROCHE protease inhibitor), the comparable amounts of each tissue were homogenized and 250 μl of 2 × Laemmli lysis buffer (cat S3401; Sigma-Aldrich) was added immediately. Finally, the samples were vortexed and boiled for 5 min, a process which was repeated three more times reaching a total of 20 min. Samples were stored at -80°C until use.

Total proteins obtained from tissue lysates were separated by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Samples were run at 100 V in TRIS-Glycine-SDS buffer at pH 8.3 for 2 hr 30 min. Once electrophoresis was completed, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories) in TRIS-glycine-methanol buffer pH 8.3 at 4°C. This process was performed at 25 V with 200 mA current, for 1 hr at low temperature. At the end of the transfer, the nitrocellulose membrane was blocked with 2% skim milk (Svelty, Nestle, CDMX, México) for 24 hr. Membranes were incubated with the primary antibodies against SOX9 (1:500), TRPV4 (1:500), VASA (1:500), and FOXL2 (1:500) overnight at 4°C under continuous agitation. The next day, the nitrocellulose membrane was washed three times for 5 min with 5 ml of the 1 × PBS pH 7.1 buffer. The membrane was then incubated with a secondary antibody coupled to anti-rabbit HRP (A16104; Invitrogen, CA, USA) for 1 hr 30 min at room temperature. The membranes were then washed again three times with 20 ml of 1 × PBS for 5 min and the protein was detected by

means of chemiluminescence BM Chemiluminescence Western Blotting Mouse/Rabbit (34075; ThermoScientific, Rockford, IL). Finally, membranes were exposed to ray plates (Amersham Hyperfilm™ ECL, Buckinghamshire, UK) for 1 to 5 min. The bands corresponding to each protein were obtained by triplicate for each sample. The optical density (Intensity/mm²) for each band was quantified by densitometry using the Quantity One programme (Bio-Rad Laboratories). The optical density of each sample was normalized with respect to the corresponding actin values. The expression values for each protein are presented as arbitrary relative expression communities, obtained by the ratio of the protein of interest/actin for each sample. Relative expression values are presented as the means of independent experiments ± standard deviation. One-way ANOVA, followed by a Tukey multiple comparison test with a 95% confidence interval was performed, using the Statgraphics Centurion XV statistical programme.

3 | RESULTS

3.1 | Morphology of the 5-year-old *C. moreletii* testis

The testes are oval-shaped organs that are histologically composed of seminiferous cords delimited by a basal membrane. Histological examination of the testes revealed that there was no lumen within the seminiferous cord (Figure 1A), but Sertoli cells (Figure 1B, D, and E) and some spermatogonia (Figure 1C) were visible inside the seminiferous cord; however, there was no evidence of spermatogenesis. These morphological characteristics resembled those described for other vertebrates during pre-puberty and in mammals. Likewise, the presence of myoid cells and fibroblasts arranged in an extracellular matrix mainly consisting of collagen fibers (Figure 1F and G) was observed towards the exterior of the seminiferous cord. The presence of Leydig cells, identified by the regular shape of their nucleus (Figure 1H) and the presence of lipid droplets, with the latter associated with their steroidogenic nature was apparent between the interstitial tissue.

3.2 | Localization of SOX9, FOXL2, VASA, and the ion channel TRPV4 in the testicle of *C. moreletii*

The SOX9 protein was localized in the nucleus of Sertoli cells, which are located at the periphery of the seminiferous cords forming the blood-testis barrier (Figure 2A and D). The seminiferous cords were delimited using an antibody against Laminin, an important component of the extracellular matrix. Laminin, apart from being localized in the basement membranes of the seminiferous cords, was also distributed in the stromal compartment of the testes. Considering FOXL2, only a weak signal appeared to be localized in randomly distributed epithelial cells in the testis of *C. moreletii* (Figure 3E and F). In the case of VASA protein, its expression was observed in the cytoplasm of germ cells or spermatogonia, within the seminiferous cords (Figure 4A). Double labeling with VASA and SOX9 resulted in a similar localization. SOX9 was observed in the nuclei of Sertoli cells localized in the blood-testis barrier, and VASA was detected in the cytoplasm of spermatogonia located inside the seminiferous cord (Figure 4B and C). Expression of TRPV4

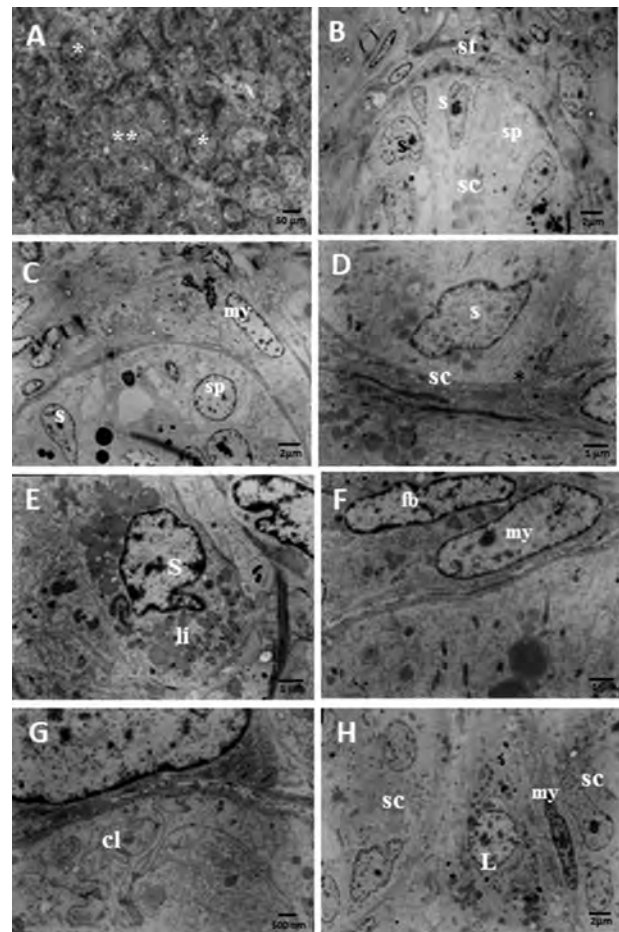


FIGURE 1 Gross morphology and transmission electron microscopy of the testis of 5-year-old *C. moreletii*. (A) Transverse section of the testis showing testicular cords with both round (*) and elongated (**) morphology. (B) Seminiferous cord (sc) formed from Sertoli cells (s) and spermatogonia (sp). Outside the cord, the stromal compartment (st) is evident. (C) With greater amplification, we observe part of a seminiferous cord (sc) containing Sertoli cells (s) and spermatogonia (sp). In the stromal compartment, some myoid cells (my) are visible. (D) Detail of the nucleus of a Sertoli cell (s) adjacent to the basement membrane of seminiferous cord (sc). (E) A Sertoli cell (s) is shown, identified by its irregular nucleus and large amount of lipids (li) in its cytoplasm. (F) Myoid cells (my) and fibroblasts (fb) located in the stromal compartment of the testicles. (G) Collagen fibers (cl) in the cytoplasm of a myoid cell. (H) A Leydig (L) cell is shown located between two seminiferous cords (sc) and adjacent to a myoid cell (my)

ion channel protein was mainly detected on the membrane and cytoplasm of Sertoli cells, as well on the membrane of stromal cells surrounding the cords (Figure 4D and E). Double labeling with the SOX9 protein corroborated the pattern of TRPV4 expression on the membrane and in the cytoplasm of Sertoli cells located at the periphery of the testicular cords (Figure 4F).

3.3 | Detection of Δ^5 - 3β HSD activity in the testis of *C. moreletii*

Δ^5 - 3β HSD activity was detected by accumulation of formazan granular deposits as a result of hydroxysteroid hydrogen transfer to the

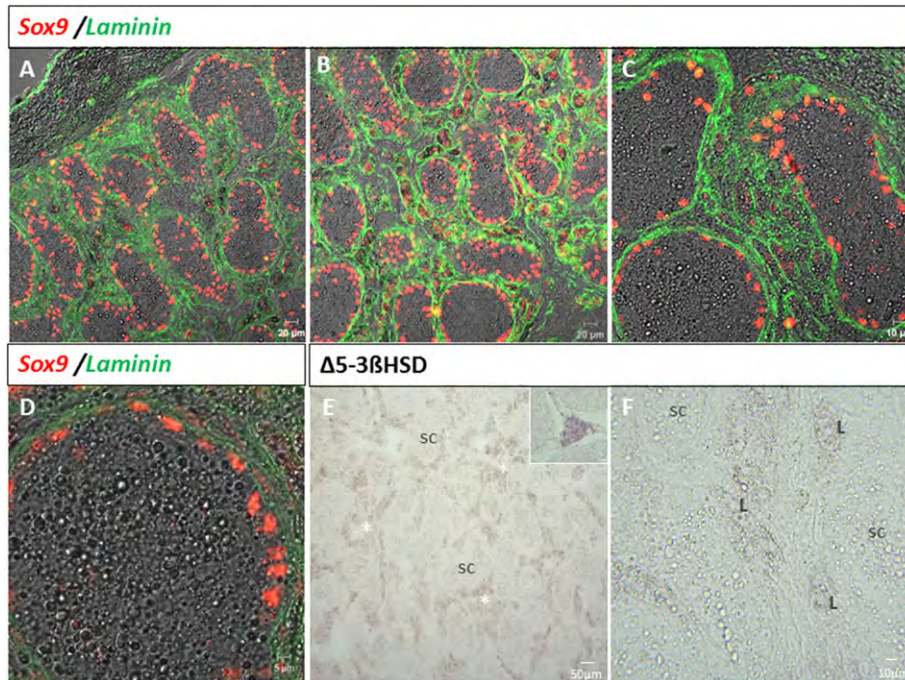


FIGURE 2 Expression of SOX9 transcription factor, Laminin and detection of Δ^5 - 3β HSD activity in the testis of 5-year-old *C. moreletii* males. (A and B) Transverse section of the testis showing the seminiferous cords delimited by laminin expression (green) and SOX9 (red). (C) Amplification of B, where the nuclei of the Sertoli cells expressing the SOX9 protein can be observed in red and Laminin protein delimiting the seminiferous cords and marking the interstice of the testicle are in green. (E) Detection of Δ^5 - 3β HSD activity in interstitial cells (*) located between the seminiferous cords (sc). Mouse testis was used as a positive control for Δ^5 - 3β HSD, where activity is specific in Leydig cells (insert in E). (F) Amplification of (E), where weak activity is visible in cells with characteristics of Leydig (L) cells [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

tetrazolium salt via a pyridine nucleotide (NAD⁺). In this way, the salt is reduced, and because the reduced form is insoluble and colored (formazan salt), it is deposited at the reaction site. We observed weak Δ^5 - 3β HSD activity in the testis of *C. moreletii* compared with the activity detected in the mouse testis that was used as a positive control for this technique. However, it was possible to detect a weak signal in the stromal compartment surrounding the testicular cords, where Leydig cells are generally located in the testis of vertebrates (Figure 2E). Analyzing the accumulation of formazan granule deposits in greater detail, these deposits were subtly detected in cells with steroidogenic cell characteristics as evidenced by lipid accumulation (Figure 2F). As a positive control of the reaction, sections of adult mouse testis were used, where activity was specifically detected in Leydig cells (insert, Figure 2E).

3.4 | Morphology of the 5-year-old *C. moreletii* ovary

Fragments of *C. moreletii* ovaries were processed for structural and ultrastructural analysis by light and electron microscopy, respectively. Oocytes were classified according to stage of development based on the description by Uribe et al. (2000) for *A. mississippiensis*. In the ovaries of *C. moreletii* females, two defining areas are evident: the stromal compartment, characterized by the presence of lacunae (Figure 5A), and the ovarian cortex (Figure 5B). The cortical surface of the ovary consists of oogonia grouped into cell niches (Figure 5D), as well as primary follicles (Figure 5C and D), where follicular somatic cells surround the oocytes and form a simple cuboidal epithelium (Figure 5E). Most of the developing follicles are at stages I, II, and III

(Figure 5B and C), which are principally characterized by increased cytoplasm in the oocyte as well as an increase in organelles such as the endoplasmic reticulum, mitochondria, and ribosomes. The follicular epithelium of the developing oogonia is formed from a single layer of granulosa cells located on a basement membrane (Figure 5E and F). The follicular tissue is surrounded by theca cells arranged between the connective tissue (Figure 5F). Theca cells are, in turn, organized into cells of the inner theca, which is rich in collagen fibers, together with the vascularized outer theca (Figure 5F and I). Oocytes were apparently undergoing previtellogenesis, as shown by the accumulation of vitelline granules in the cytoplasm (Figure 5G), and the cytoplasmic projections (Figure 5H). The presence of several blood vessels also indicates that this is a highly irrigated tissue (Figure 5I).

3.5 | Localization of SOX9, FOXL2, VASA, and the ion channel TRPV4 proteins in the *C. moreletii* ovary

According to the methodology described, the SOX9 protein was detected by immunofluorescence in the ovaries of 5-year-old female *C. moreletii*. Surprisingly, we found the SOX9 transcription factor protein localized in the nucleus of the granulosa cells of previtellogenic oocytes, as well as in some cells that compose the theca of the ovary (Figure 6A–D). To delimit the localization of SOX9, double labeling was performed with the Laminin antibody, which confirmed the localization of SOX9 in the cell nucleus of the granulosa and some cells of the stromal compartment (Figure 6A–D). Concerning the localization of the FOXL2 protein in the ovary, it was found in the nuclei of the granulosa

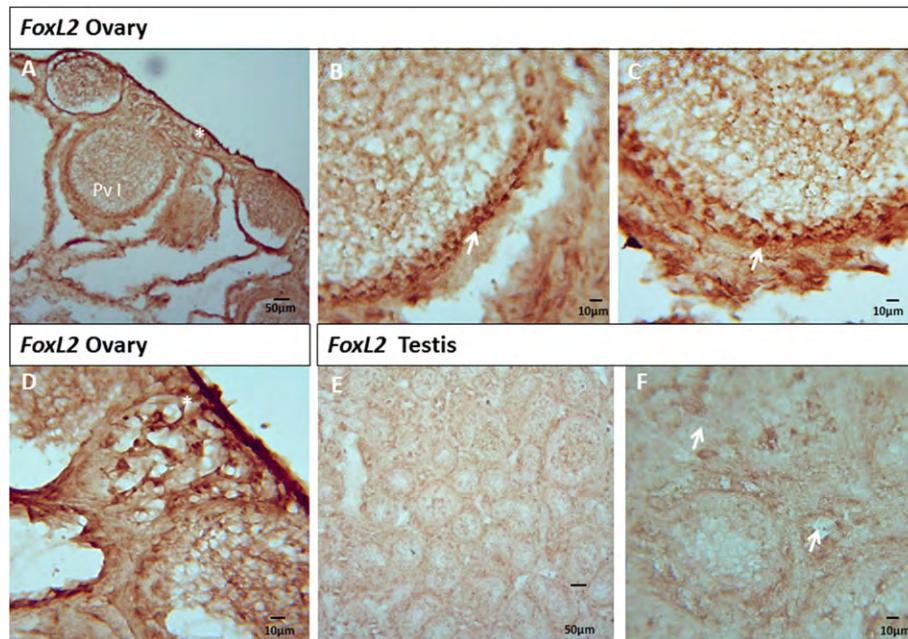


FIGURE 3 Expression of the FOXL2 transcription factor in the ovary and testis of 5-year-old *C. moreletii* individuals. (A) Cross-section of the ovary where previtellogenic oocytes I (pv I) are visible, the asterisk denotes oogonial niches. (B) and (C), amplification of (A), where nuclei of granulosa cells expressing FOXL2 (arrows) are visible. (D) Amplification of (A), where some oogonial niches are apparently being surrounded by somatic cells expressing FOXL2 (*). (E) In the testis, only a weak FOXL2 signal was evident in some randomly distributed cells. (F) Amplification of (E) showing some cells positive to FOXL2 (arrows) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

cells of previtellogenic oocytes and surrounding some oogonial niches (Figure 3A and D). Likewise, immunofluorescence was carried out to detect the expression of VASA and TRPV4 proteins. The RNA helicase VASA was localized in the cytoplasm of oogonia grouped into cell niches (Figure 7A–C) and in the cytoplasm of type II, previtellogenic oocytes (Figure 7B). Notably, as folliculogenesis and stages of previtellogenesis progress, the expression of VASA protein decreased until it practically disappeared. The TRPV4 ion channel protein (Figure 7D–F) was localized in the cytoplasm and on the membrane of follicular cells (Figure 7E) and in ovarian stroma (Figure 7F).

3.6 | Detection of Δ^5 -3 β HSD activity in the *C. moreletii* ovary

In the ovaries of *C. moreletii*, deposits of formazan, which is a sign of steroidogenic activity, were detected in a few cells located in the region of the theca of the follicles (Figure 6E and F). A weak signal was also observed at the periphery of the cytoplasm of stage III previtellogenic oocytes. As in the testis of *C. moreletii*, sections of adult mouse testis were used as a positive control for the experiment, where steroidogenic activity was specifically detected in Leydig cells (insert Figure 6E).

3.7 | Semi-quantification of *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* mRNA in female and male *C. moreletii*

Expression of the transcripts of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes was detected by end-point RT-PCR using RNA obtained from the ovaries and testes of *C. moreletii* (Figure 8). *Sox9*, *Vasa* and *Foxl2*

transcripts were observed in both ovaries and testes (Figure 8A). The relative expression levels for *Sox9*, *Foxl2*, and *Vasa* are shown in Figure 8B. Our statistical analysis showed that there are no significant differences in the expression of *Sox9* and *Vasa* between the ovary and testis, whereas *Foxl2* expression showed significant differences between the two sexes, with significantly lower expression of transcripts in the testes. In the particular case of the *TRPV4* gene, the mRNA was found in both females and males (Figure 8C), and statistical analysis did not show significant differences between the two sexes. The relative expression levels for the *TRPV4* gene are shown in Figure 8D. For sequencing of RT-PCR products, partial fragments of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes were obtained. Our sequence analysis showed that the fragments obtained are similar to sequences from reptiles and other vertebrates previously reported in GenBank. Reported sequences and similarity percentages observed for each gene are presented in Table 2.

3.8 | Protein quantification of SOX9, FOXL2, VASA, and TRPV4 in *C. moreletii* ovaries and testes

Protein quantification was performed using Western blot analysis (Figure 9). We observed that, similar to results obtained for the localization of the protein for the SOX9 transcription factor, SOX9 was expressed in both sexes; however, the expression of this protein was greater in the testes than in the ovaries. Additionally, as RT-PCR revealed, the expression of the transcription factor protein FOXL2 was considerably higher in the ovary compared to the levels detected in the testis. Considering the RNA helicase VASA, we observed that VASA was expressed both in the testis and the ovary; however, its levels were

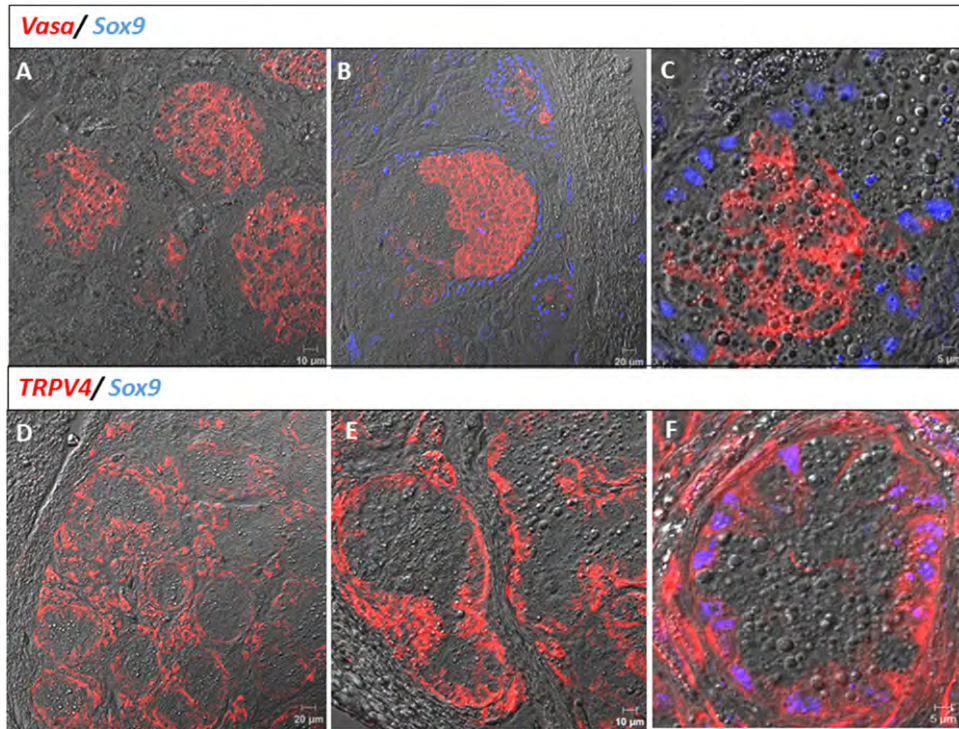


FIGURE 4 Expression of RNA helicase VASA and TRPV4 ion channel in the testis of 5-year-old *C. moreletii* males. (A) Cross-section of the testis where the expression of the RNA helicase VASA in the cytoplasm of spermatogonia is visible in red. (B) Double immunofluorescence where the cytoplasm of spermatogonia is marked in red and the nuclei of the Sertoli cells within the seminiferous cord are marked in blue. (C) Amplification of (B). (D) TRPV4 ion channel was detected on the membrane and in the cytoplasm of Sertoli cells (red). (E) A seminiferous cord marked with TRPV4 is shown at higher magnification. (F) Double labeling where the expression of Sox9 protein is detected in the nucleus of the Sertoli cells, whereas the expression of TRPV4 is presented in red, in both the cytoplasm and membrane of Sertoli cells, as well as in some cell types that make up the stromal compartment (red), such as myoid cells (my) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

higher in the testis. Similarly, expression of the TRPV4 ion channel was found in the testes and ovaries, but its expression was higher in the testis of *C. moreletii* (Figure 9B).

4 | DISCUSSION

4.1 | Sexual maturity in *C. moreletii*

It has been reported that sexual maturity in *A. mississippiensis* occurs between 6 and 10 years of age and that this difference is mainly due to variations between geographic regions. For body size, males vary between 1.8 and 2.2 m; although, according to field observations, alligators smaller than 2.7 m are not able to reproduce. In contrast, females reach sexual maturity at 10 years of age upon reaching an average size of 1.8 m (Lance, 1989). In the *C. moreletii* species, it has been suggested that females reach sexual maturity between 7 and 8 years of age or at 1.5 m in length, and males at 8 years of age or between 1.8 and 2.7 m in length. The organisms sampled in this study were between 75 and 98 cm in length, suggesting that they have not yet reached sexual maturity, which is consistent with the histological results obtained for the ovaries and testes. Considering the size of the individual at sexual maturity is important because of the social factor, which is best observed in males; this is because if they reach the appropriate size before the reproductive age, they can successfully reproduce with

females (Casas-Andreu, Barrios-Quiroz, & Macias-Ríos, 2011; Platt, Rainwater, Thorbjarnarson, & McMurry, 2008).

4.2 | Expression of the *Sox9*, *Foxl2*, and *Vasa* genes

In the present study, we analyzed the expression of genes important for testis function, that is, *Sox9*, a gene which was expressed in testes as expected; however surprisingly, its expression was also found in the ovary. Interestingly, although SOX9 is expressed in both sexes, the expression levels for this transcription factor were higher in males than in females. So far, the role of the *Sox9* gene in the ovaries of adult females has not been clear. However, in other vertebrates such as *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*, and *Chapalichthys encaustus*, *Sox9* expression has been observed in adult female oocytes (Chiang et al., 2001; El Jamil, Kanhoush, Magre, Boizet-Bonhoure, and Penrad-Mobayed, 2008; Guerrero-Estévez et al., 2012). In these studies, two isoforms of the *Sox9* gene have been found: the *Sox9a* isoform expressed in the testis of *D. rerio* and the *Sox9b* isoform expressed in previtellogenic oocytes of the same species (Chiang et al., 2001). The antibody we used for this study recognizes both isoforms of *Sox9*. This would explain its detection in the analyzed testes and ovaries of *C. moreletii*. Physiologically, the role of *Sox9* in the oocyte is still unknown; however, it has been proposed that this gene acquired a new function during evolution (Figure 10A). In the case of the mouse, *Sox9* was thought to be involved in folliculogenesis, where its expression apparently depends on the

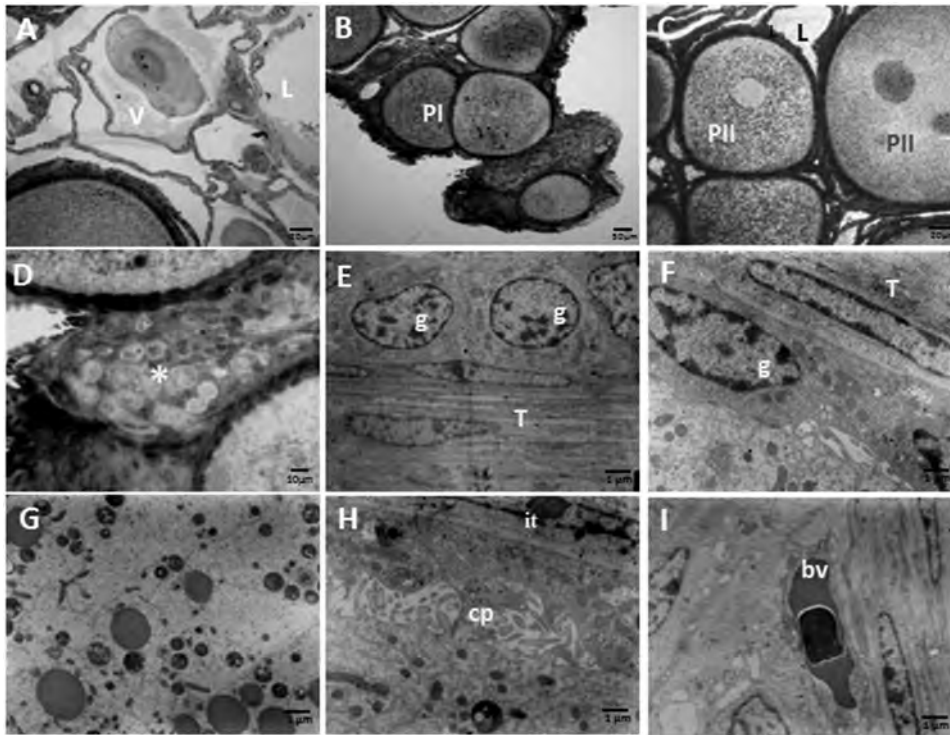


FIGURE 5 Gross morphology and electron microscopy of the ovary of 5-year-old *C. moreletii* females. (A) Stromal compartment of the ovary made up of lacunae (L) and blood vessels (V). (B) Previtellogenic oocytes at stage I (PI). (C) Previtellogenic oocytes at stage II (PII) and III (PIII). (D) Groups of oogonia in cellular niches (*). (E) Cells of granulosa (g) on a basement membrane and theca cells (T). (F) Cells of granulosa cells (g) and nuclei of inner theca cells (T). (G) Cytoplasm of the oocyte. (H) Cytoplasmic prolongations (cp) that join the oocyte to its inner theca (it). (I) Blood vessels (bv) located in the external theca of the follicle

stage of follicle development, such that *SOX9* is expressed more in pre-antral oocytes and its expression is reduced in antral oocytes until it disappears in preovulatory oocytes (Notarnicola, Malki, Berta, Poulat, & Boizet-Bonhoure, 2006). Likewise, as we discovered the expression of *Sox9* in previtellogenic oocytes, it would be interesting to evaluate ovaries from 8-year-old females already involved in reproduction. This may be the case in mouse, in which the expression of *Sox9* is inhibited, and this would corroborate a possible role for *Sox9* in the regulation of follicle formation (Notarnicola et al., 2006).

Although the morphological changes that occur in the developing testes and ovaries are well defined in some species with sexual determination by temperature (DST), the genetic regulation of gonadal morphogenesis is poorly understood. However, it is to be expected that genes involved in DST and sensitive to temperature will be expressed in a space-time manner according to the morphological changes that occur during gonadal differentiation. In the testicle of *C. moreletii*, the *Sox9* protein is detected in the somatic cells that correspond to Sertoli cells and coincides with their location within the seminiferous cords. Therefore, in a way similar to that reported in other reptiles and vertebrates in general, the *Sox9* gene in *C. moreletii* may play a role in the development of testicular structures and thus in the differentiation and maintenance of the testicle. The functional importance of *Sox9* in the differentiation of the masculine phenotype (testicular differentiation) has been amply reported among vertebrates (Kent, Wheatley, Andrews, Sinclair, & Koopman, 1996; Morais da Silva et al., 1996; Moreno-Mendoza et al., 1999; Spotila, Spotila, & Hall, 1998).

The expression of *Sox9* during ovarian morphogenesis of reptiles has also been studied. It has been reported that although in early stages of embryonic development *Sox9* is expressed in the gonads of embryos incubated at both temperatures, subsequently dimorphic expression takes place, where *Sox9* is negatively regulated at feminizing temperature (Moreno-Mendoza et al., 1999; Spotila et al., 1998; Western et al., 1999). Concerning expression of *Sox9* in the ovary of post-hatched crocodiles; this has not been studied. The pattern found in *C. moreletii* has characteristics similar to that reported in teleost fish and in *Xenopus tropicalis*. In the case of teleosts, two isoforms of the gene have been described, one specific to the ovary and another specific to the testicle with different functions. In this way, we suggest that in post-hatched organisms, the expression of one of the *Sox9* isoforms (*Sox9a*) in the Sertoli cells maintains testicular structure and function, whereas in the ovary the other isoform of the *Sox9* (*Sox9b*) gene, when expressing itself in the granulosa cells of previtellogenic oocytes may be involved in the process of folliculogenesis, where its expression apparently depends on the degree of follicular development, as has also been proposed in the case of mice (Notarnicola et al., 2006). Therefore, we suggest that in *C. moreletii*, the expression of *Sox9a* must occur before and during gonad differentiation, as it is negatively regulated during ovarian differentiation and maintains its expression in the developing testicle. Subsequently, in the adult testicle, its expression is maintained in the support cells to maintain testicular function. In adult ovaries, the follicular cells of previtellogenic oocytes express *Sox9b*, favoring a biological role that differs from this gene during the later stages of oogenesis.

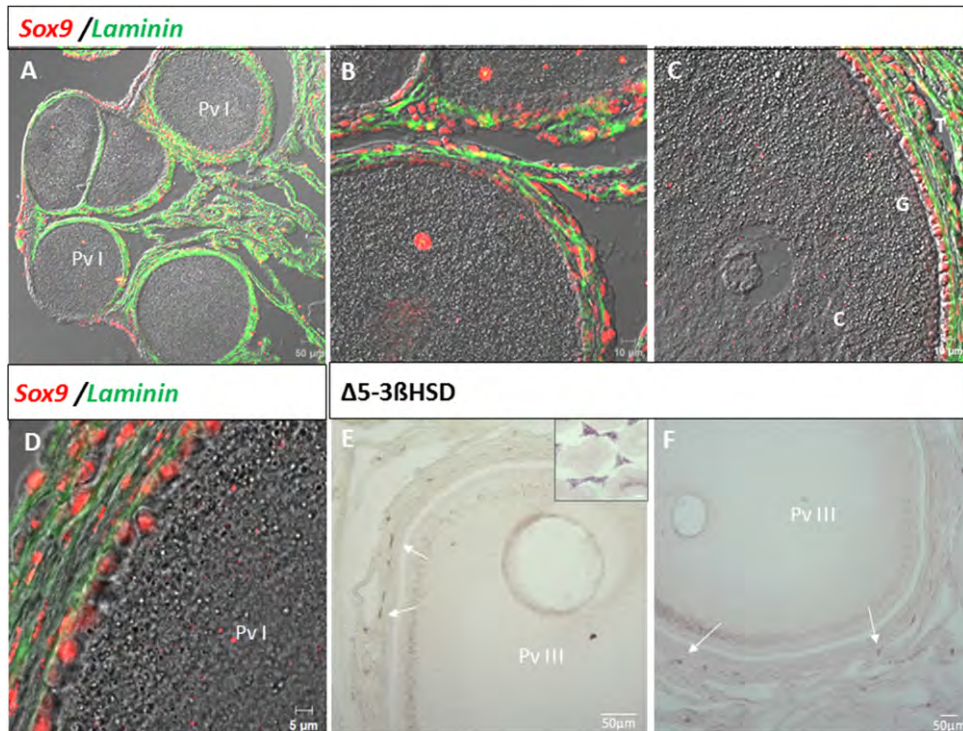


FIGURE 6 Expression of SOX9, Laminin and Δ^5 -3 β HSD in the ovary of 5-year-old *C. moreletii* females. (A) Cross-section of the ovary, where previtellogenic oocytes (pv) are shown. (B–D) Amplification of A, where granulosa cells that express the SOX9 protein in their nucleus in red and expression of laminin, which delimits the oocyte in green. G (granulosa), T (theca), and C (cytoplasm). (E and F) Detection of Δ^5 -3 β HSD activity in theca cells (arrows) of previtellogenic oocytes III (PvIII). Mouse testis was used as a positive control for Δ^5 -3 β HSD, where activity is specific in Leydig cells (insert in E) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

As for genes that maintain the function and morphology of the ovary such as *Foxl2*, we find higher levels of expression of the mRNA and protein in ovaries, whereas levels of transcripts in the testes are barely perceptible; however, these levels are sufficient to produce translated *Foxl2* protein. In the ovaries, we specifically found the expression of FOXL2 in the granulosa cells of previtellogenic oocytes, which is consistent with the idea that the expression pattern for the *Foxl2* gene is highly conserved throughout evolution (Figure 10B) (Bertho et al., 2016). It has been proposed that the expression of the *Foxl2* gene is essential for the differentiation of granulosa cells and maintenance of the ovary, by negatively regulating the expression of *Sox9*. In the absence of *Foxl2*, there is no differentiation of the granulosa cells and therefore there is no formation of secondary follicles from primary follicles, as these die by apoptosis in the absence of functional granulosa cells. As reported, *Foxl2* in our findings for *C. moreletii* presents a sexually dimorphic expression pattern, so it can be considered an indicator of functional female heterogamy (Cocquet et al., 2018; Schmidt et al., 2004; Shoemaker-Daly et al., 2010). The presence of *Foxl2* transcripts in the testis has been previously reported during embryonic development and in juvenile organisms of *A. mississippiensis*, where an alternative *Foxl2* function is suggested in addition to the role it plays in ovarian development (Janes et al., 2013). In this regard, the present study corroborates the expression of *Foxl2* gene both in its transcripts and in its protein, but only in 5-year-old organisms, where sexual maturity has not yet been reached. Based on observations made concerning *A. mississippiensis* and those described in this study for *C. moreletii*,

we posit that *Sox9* and *Foxl2* may at some point be coexpressed during gonadal morphogenesis to carry out some unknown function, possibly related to the mechanism of DST, and later expressed dimorphically to influence another function, such as sexual maturity, in the ovaries and testes. According to our observations, being organisms that have not reached sexual maturity, the expression pattern of both the protein and the *Foxl2* transcripts suggests that in *C. moreletii* the expression of this gene remains in the granulosa cells of the ovary as it continues to regulate the maintenance of ovarian functionality.

As for the *Vasa* gene, the RNA helicase expressed during specification of the germinal line, we find its expression both in oogonia that are aggregated in cellular niches and in the cytoplasm of type II previtellogenic oocytes; in oocytes at more advanced stages, the expression of this gene is no longer detected. VASA expression in oogonia grouped in niches within the ovary cortex is interesting, as characteristically this gene is expressed in progenitor cells of the germinal line (Seydoux et al., 1999), which is why it possibly plays a role in maintaining the pool of oogonia during oogenesis. Their expression was also found in spermatogonia of the testis. In this respect, it is known that, in mouse, the *Vasa* gene plays a very important role both in the specification and in the maintenance of germline fertility that will give rise to spermatozoa (Tanaka et al., 2000). *Vasa* mRNA expression levels remained similar in both sexes; however, in the case of the protein, it was detected at a slightly greater level in the testes. These findings may be because, in the ovary, VASA protein is detected only in cell groups similar to niches. In addition to the fact that as the

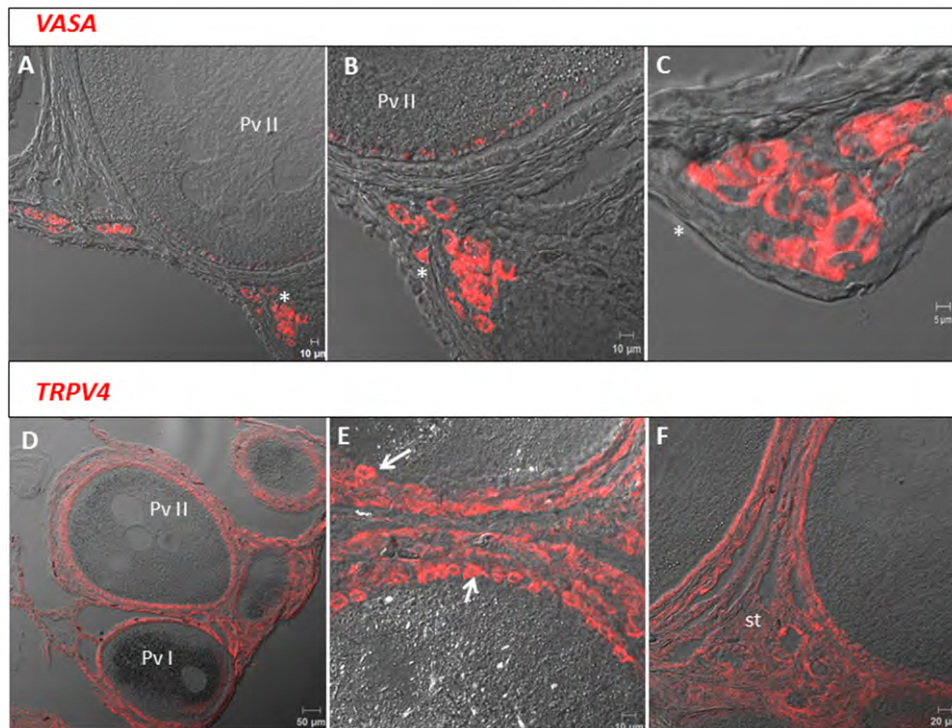


FIGURE 7 Expression of RNA helicase VASA and TRPV4 ion channel in the ovary of 5-year-old *C. moreletii* females. (A) Cross-section showing the ovarian cortex with expression of RNA helicase VASA. (B) Expression of VASA in the cytoplasm of an oocyte at previtellogenesis stage II (Pv-II) and in the cytoplasm of oogonia grouped in niches (*). (C) Amplification of (B) where the expression of VASA (red mark) in the cytoplasm of oogonia that form niches can be detected (*). (D) Cross-section showing expression of TRPV4 protein (red) in previtellogenic oocytes I and II. (E) At greater magnification, the expression of TRPV4 is visible in the membrane and cytoplasm of the follicular cells surrounding the oocyte (arrows) and (F) in components of the stroma (st) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

follicular stage progressed and the follicles became previtellogenic, the expression of VASA decreased considerably. Conversely, in the case of the testes, VASA was expressed in all spermatogonia that compose the testicular cords, which probably represent the majority of cells that express RNA helicase. These results are of interest because, so far, VASA expression has not been reported in crocodiles; however, their expression pattern is very similar to other vertebrates (Figure 10C).

4.3 | Expression of the TRPV4 ion channel

In mammals, the *SRY* gene positively regulates the expression of the *Sox9* gene; however, reptiles lack the *SRY* gene (Coriant et al., 1994). Thus, it is possible there is another signaling pathway that promotes the upregulation of *Sox9*. We found the expression of the TRPV4 ion channel protein on the membrane of Sertoli cells as well as the expression of the *Sox9* gene in the nucleus of Sertoli cells. This ion channel has been studied in other reptiles and, according to our findings, its identity is closely related to *C. moreletii* (Figure 10D). Our results were made even more interesting as we found that males express a greater amount of SOX9 and TRPV4 than females. Moreover, although there was no significant difference in mRNA expression of TRPV4 between males and females, there was a slight tendency for females to express more TRPV4 mRNA, which may be related to more protein being translated in males. In works performed on chondrocytes, it has been well documented that the TRPV4 ion channel can positively regulate

the SOX9 transcription factor (Muramatsu et al., 2007). Likewise, it is thought that the same may be occurring in the Sertoli cells of the crocodile testicle, and within this regulation, it may be that elements of the signaling pathway known to be involved in the regulation of the *Sox9* gene in mammals are conserved such as protein kinase A (PKA), the prostaglandins receptor and cAMP (Juhász et al., 2014; Muramatsu et al., 2007). We therefore suggest that a possible explanation for this pattern of TRPV4 expression in Sertoli cells is to maintain regulation of the expression of the *Sox9* gene in the testis. We propose that the signaling pathway of TRPV4 in both ovaries and testes possibly retains elements, but that each has its particularities. In this regard, it has been proposed that the expression of the transcription factor *Sox9* plays a possible role in the nucleus of follicular cells; promoting the production of extracellular matrix (Darby et al., 2016). In the case of the ion channel TRPV4, it is thought that this represents a very important sensor for the environment of the follicle, in the sense that it regulates the production of the extracellular matrix during its maturation and formation. In the case of *Sox9* in the testicle, it is thought that this is a transcription factor that maintains the cell-cell junctions, promoting spermatogenesis and fertility in the testicle, as well as the production of extracellular matrix. Particularly in the case of the TRPV4 ion channel, it is suggested that this is a sensor that regulates the *Sox9* gene when Ca^{2+} enters, and that may promote via the kinase A (PKA) protein, known for the role it plays stimulating the phosphorylation of the *Sox9* transcription factor, promoting its translocation to the nucleus, where it interacts

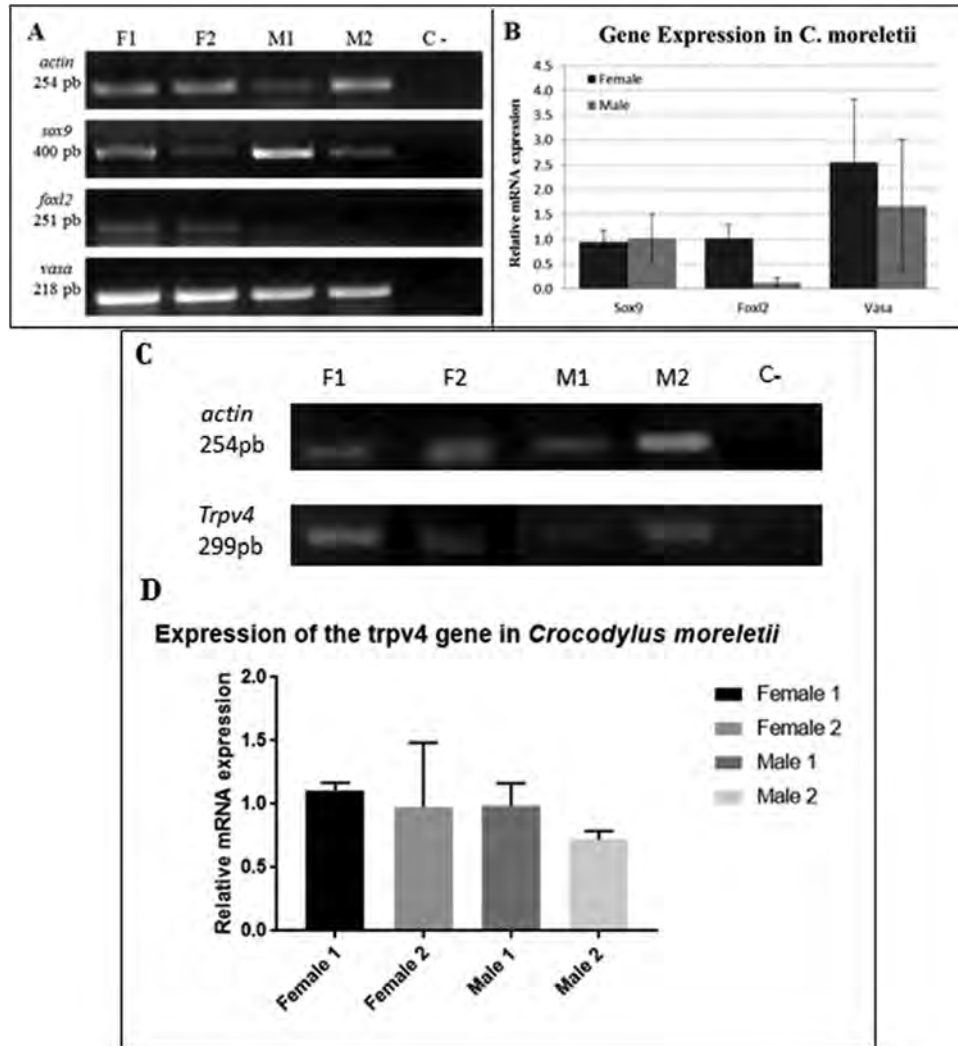


FIGURE 8 Relative mRNA expression of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *Trpv4* genes in the testis and ovary of *C. moreletii*. (A) Representative gels showing the amplification of specific fragments in ovaries (F1 and F2) and testis (M1 and M2) of *C. moreletii*. Bands correspond to mRNA fragments of *Sox9* (400 bp), *Foxl2* (251 bp), and *Vasa* (218 bp). Actin detection (254 bp) was used as an internal control. (B) Graph showing the levels of relative expression obtained in the densitometric analysis. The *Sox9* and *Vasa* genes did not show significant differences between females and males, whereas *Foxl2* showed significant differences between the sexes. (C) Representative agarose gel showing the amplification of fragments from the *Trpv4* gene. The bands correspond to fragments of 299 bp. (D) The expression of the *Trpv4* gene did not show significant differences between females and males; ($P < 0.05$)

with other transcription factors and stimulates the cellular processes mentioned above (Juhász et al., 2014; Muramatsu et al., 2007).

4.4 | Δ^5 -3 β HSD activity and histology of the ovary and testicle

We have obtained novel results concerning the morphology of the reproductive organs of the 5-year-old *C. moreletii* crocodile that corroborate our observations regarding specific protein and mRNA expression. The first to study the morphology of the ovary in a crocodile was Dutta (1949-1953), who described the ovaries in *C. palustris* and *Gavialis gangeticus*. The ovary of *A. mississippiensis* was described by Joanen and McNease in 1980 and in more recent studies by Uribe et al. in 2000 and Moore et al. in 2010. Generally, these studies have been carried out on adult and neonatal crocodiles from one week

up to 5 months post-hatching. We performed the histological analysis of *C. moreletii* females at 5 years of age using electron microscopy and we observed oogonia forming cell groups similar to niches. Herein, we also observed that the histological sections were interconnected and surrounded by somatic cells, as observed Moore et al., 2010 in hatchlings of up to 5 months of age. We also found most oocytes present at different stages of previtellogenesis, as oocytes can be observed when they begin to grow (Previtellogenesis I) and when they are surrounded by follicular cells and few theca cells (Previtellogenesis III). We did not find oocytes in previtellogenesis IV and V. Most oocytes in Previtellogenesis III had some cells in the theca region that were Δ^5 -3 β HSD-positive, suggesting that steroidogenic precursor cells have initiated their activity in 5-year-old *C. moreletii* females. Apparently, ovaries already have a morphology similar to that observed in *A. mississippiensis* and other reptiles.

TABLE 2 Analysis of Similarity of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, *TRPV4*, and *Actin* Sequences

Description	Query Cover (%)	Ident (%)	GenBankAccession
Sox9			
<i>Crocodylus palustris</i> Sox9 (Sox9) gene, complete cds, alternatively spliced	95	100	FJ790140
<i>Alligator mississippiensis</i> SRY-box 9 (SOX9), mRNA	78	96	NM_001287268.1
<i>Eublepharis macularius</i> Sox9 (Sox9) mRNA partialcds	76	91	AF217252.1
<i>Canis lupus familiaris</i> SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9),	76	91	NM_001002978.1
<i>Lepidochelys olivacea</i> Sox9 (Sox9) mRNA, complete cds	78	90	GQ258676.1
<i>Macaca mulatta</i> SRY-box 9 (SOX), mRNA	74	90	NM_001032868.1
<i>Callithrix jacchus</i> SOX9 mRNA, complete cds	74	90	AF322899.1
<i>Pongo pygmaeus</i> SOX9 mRNA, complete cds	74	90	AF322898.1
<i>Gallus gallus</i> SRY (sex-determining regionY)-box (SOX9), mRNA	74	90	NM_204281.1
<i>Homo sapiens</i> SRY-box 9 (SOX9), mRNA	74	90	NM_000346.3
Foxl2			
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	96	99	XM_006258812.2
Predicted: <i>Gavialis gangeticus</i> forkhead box L2 (FOXL2), partial mRNA	96	98	XM_019503081.1
<i>Alligator mississippiensis</i> forkhead transcription factor FOXL2 mRNA, partial cds	96	98	XM_004664203.1
Predicted: <i>Jaculus jaculus</i> forkhead box L2 (Foxl2), mRNA	96	96	XM_006158196.2
<i>Trachemys scripta</i> forkhead transcription factor L2 (FoxL2) gene	96	96	AY155535.1
Predicted: <i>Gekko japonicus</i> forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	94	96	XM_015411286.1
Vasa			
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X4, mRNA	89	97	XM_014594053.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X3, mRNA	89	97	XM_014594052.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X2, mRNA	89	97	XM_014594051.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X1, mRNA	89	97	XM_014594050.1
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X2, mRNA	89	96	XM_006021247.2
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X1, mRNA	89	96	XM_006021246.2
Predicted: <i>Pelodiscus sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), mRNA	86	82	XM_014581741.1
TRPV4			
Predicted: <i>Crocodylus porosus</i> transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4), mRNA	77	91	XM_019538691.1
Predicted: <i>Gavialis gangeticus</i> transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4), mRNA	77	88	XM_019507324.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4), transcript variant X5, mRNA	77	86	XM_019486579.1
<i>Alligator mississippiensis</i> transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4), mRNA	77	86	NM_001317145.1
Predicted: <i>Gekko japonicus</i> transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 (TRPV4), mRNA	75	84	XM_015413237.1
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 (TRPV4), mRNA	77	86	XM_006015214.2
Actin			
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> , actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	96	XM_006273980.2
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> , actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	95	XM_006022731.2
Predicted: <i>Chrysemys picta bellii</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), transcript variant X2, mRNA	92	92	XM_005299975.2
Predicted: <i>Chrysemys picta bellii</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), transcript variant X1, mRNA	92	92	XM_005299974.1
Predicted: <i>Pelecanus crispus</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (LOC104025962), mRNA	91	91	XM_009480579.1

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Description	Query Cover (%)	Ident (%)	GenBankAccession
<i>Cheloniamydas</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	91	NM_001290670.1
<i>Gallus gallus</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	83	91	NM_001079481.1
<i>Xenopus tropicalis</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	89	NM_203763.1
<i>Clupeaharengus</i> actin, alpha, skeletal muscle 2-like (LOC105907633), mRNA	92	87	NM_001309834.1
<i>Xenopuslaevis</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (actc1), mRNA	92	87	NM_001086591.1

Sequences obtained in the analysis of similitude using BLASTN software. *Sox9*, *Foxl2*, *Trpv4*, *Vasa*, and *Actin* gene had similarity to sequences corresponding to genes reported for other reptiles and other vertebrates in GenBank.

Testicle morphology in crocodiles has been studied in the American alligator *A. mississippiensis* during embryonic development (Forbes, 1940; Smith et al., 1994) and in neonatal organisms from 1 week to 3 months post-hatching (Moore et al., 2010), as well as in adults (Lance, 1989; Gribbins et al., 2010) and subadults (Cott et al., 1961; Graham et al., 1968) in the *C. niloticus* caiman. In the case of *C. moreletii* males sampled in this work, light field microscopy revealed a morphology very similar to that of an adult male of *A. mississippiensis* determined by the reproductive season and neonatal period of 3 months, where in summary the seminiferous cords are delimited by a basal membrane, Sertoli cells and spermatogonia are observed in the interior, evidenced by their morphology and the expression of SOX9 and VASA, respectively.

An interesting fact about this work is that no spermatids or spermatozoa were observed, even though samples were collected in May,

one of the months during which they are found reproducing. This is most likely because 5-year-old *C. moreletii* crocodiles have not yet reached sexual maturity. In the interstice of the testis, we found what was expected in terms of other reptiles and vertebrates, as they have myoid cells, fibroblasts (which produce extracellular matrix) and Leydig cells (which produce steroid hormones). However, Leydig cell activity is diminished, as the detection of Δ^5 - 3β HSD was scarcely perceptible, which together with histological observations, corroborates the fact that 5-year-old *C. moreletii* crocodiles are still sexually immature and that steroidogenic (Leydig) cells that are located in the interstitial region of the testis as in all vertebrates, only initiate their steroidogenic activity when male crocodiles reach 5 years of age.

In conclusion, 5-year-old females and males of *C. moreletii* are sexually immature. This is evidenced by the results obtained from the ultrastructure of their ovaries and testes, despite having been

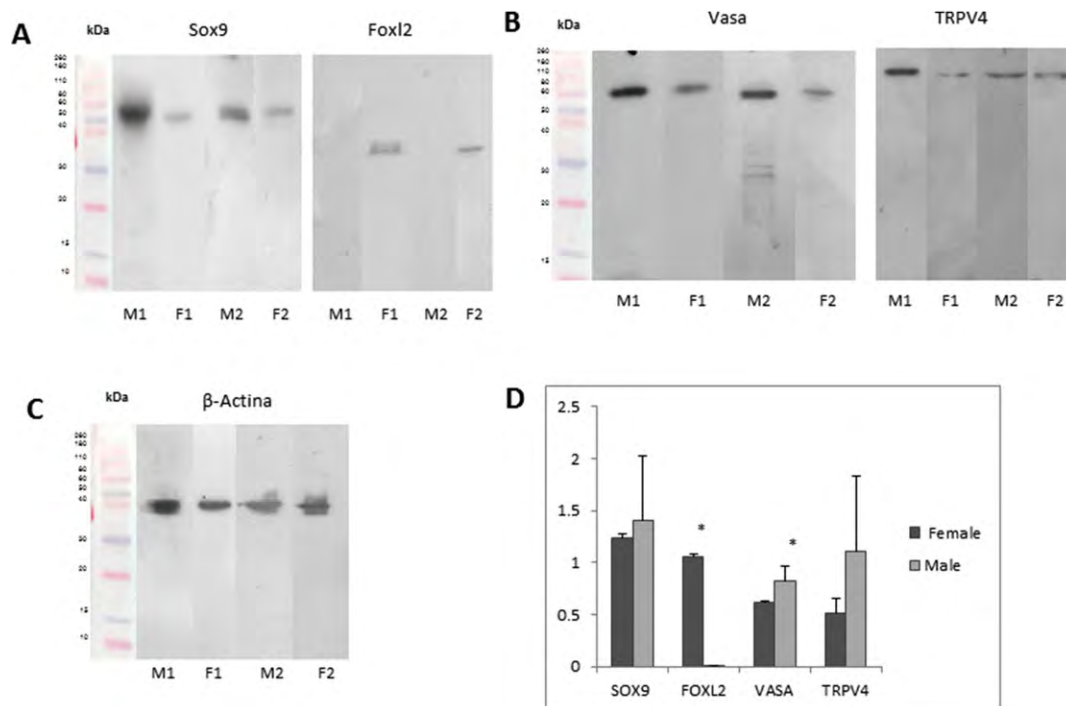


FIGURE 9 Expression of protein from genes *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *Trpv4* in the testis and ovary of *C. moreletii*. (A) Immunoblot for SOX9 (56 kDa) and FOXL2 (38 kDa); (B) VASA (76 kDa) and TRPV4 (91 kDa); and (C) smooth muscle α -Actin (42 kDa). (D) The relative expression levels obtained from the densitometric analysis of the bands obtained for each protein are visible, these were normalized with respect to actin protein. Significant differences between sexes ($P < 0.05$). Male 1 (M1), Male 2 (M2), Female 1 (F1), and Female 2 (F2) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

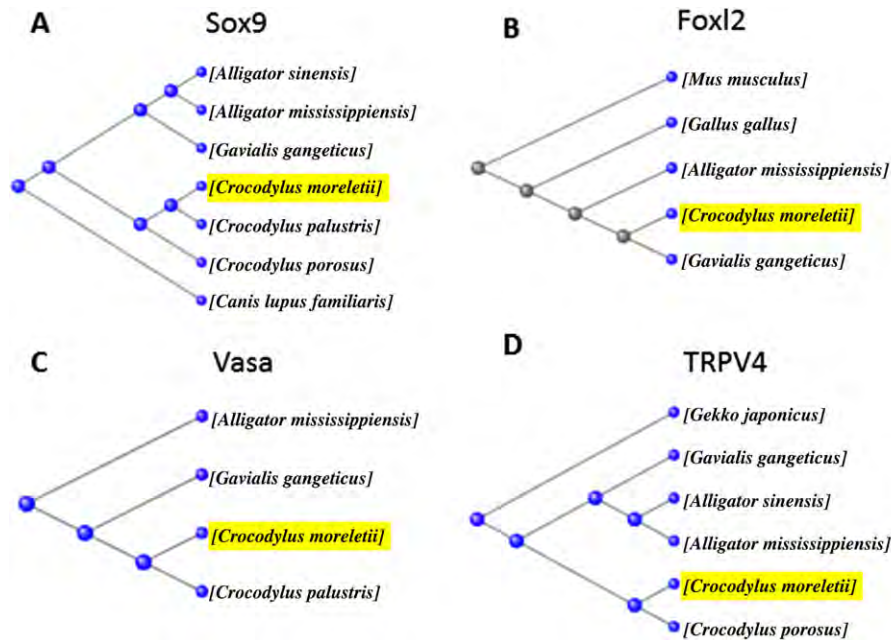


FIGURE 10 Homology for the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *Trpv4* genes of *C. moreletii*. An alignment was made to look for the homology of the sequences of the genes reported in our work, for which the BLAST program was used. The consensus tree obtained for each of the gene sequences is shown. (A) *Sox9*, (B) *Foxl2*, (C) *Vasa*, and (D) *TRPV4*. All the trees show that the sequences are highly related to those already reported for other crocodile species, as well as being highly conserved in evolution [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

collected during their breeding season. We found novel results that corroborate the expression of *Sox9* gene in females; likewise, for the first time, we were able to report the expression of the *Vasa* gene in germ cells of crocodiles. Expression of the TRPV4 ion channel was reported and we posit that it plays a role as a possible regulator of the expression of the SOX9 transcription factor in Sertoli cells. These results are therefore expected to promote future research on reproduction biology in crocodiles and generally in reptiles.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Secretary for the Environment and Natural Resources (SEMARNAT: SGPA/DGVS/05531/16) for the permit granted for the management and obtaining of biological samples. We thank to Rocio Antonio-Rubio for assistance with the animals and RT-PCR analyses. This paper is a requisite for A.M.J. to obtain a Ph.D. degree in the Posgrado en Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México.

ORCID

Norma Moreno-Mendoza  <http://orcid.org/0000-0002-3508-799X>

REFERENCES

- Bertho, S., Pasquier, J., Pan, Q., Le Trionnaire, G., Bobe, J., Postlethwait, J. H., ... Guiguen, Y. (2016). *Foxl2* and its relatives are evolutionary conserved players in gonadal sex differentiation. *Sexual Development*, 10, 111–129. <https://doi.org/10.1159/000447611>
- Braat, A. K., Zandbergen, T., Van de Water, S., Goos, H. J., & Zivkovic, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics*, 216, 153–167. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199910\)216:2<153::AID-DVDY6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199910)216:2<153::AID-DVDY6>3.0.CO;2-1)
- Casas-Andreu, G., Barrios-Quiroz, G., & Macias-Ríos, R. (2011). Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 82, 261–273.
- Chiang, E. F., Pai, C. I., Wyatt, M., Yan, Y. L., Postlethwait, J., & Chung, B. (2001). Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: Expression of similar transcription activators in distinct sites. *Developmental Biology*, 231, 149–163. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0129>
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Serval, N., Xia, X., Pannetier, M., ... Veitia, R. (2018). Evolution and expression of FOXL2. *Journal of Medical Genetics*, 39, 916–921. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.12.916>
- Coriant, A. M., Valleley, E., Ferguson, M. W. J., & Sharpe, P. T. (1994). Chromosomal and temperature-dependent sex determination: The search for conserved mechanism. *The Journal Experimental Zoology*, 270, 112–116. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700112>
- Cott, H. B. (1961). Scientific results of an inquiry into the ecology and economic status of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in Uganda and Northern Rhodesia. *Journal of Zoology*, 29, 211–356. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1961.tb00220.x>
- Darby, W. G., Grace, M. S., Baratchi, S., & McIntyre, P. (2016). Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 8, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.012>
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., ... Berta, P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 6653–6665. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6653>
- De Felici, M. (2010). Germ stem cells in the mammalian adult ovary: Considerations by a fan of the primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction*, 16, 632–636. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaa006>
- Dutta, S. K. (1949–1953). *A comparative study of the cytoplasmic inclusions in the oogenesis of reptiles*. University of Allahabad Studies. Zoology Section. (The article is divided in 11 chapters. Chapters 1–7 appeared from 1949 to 1953. Chapters 8–11 may not have been published).

- El Jamil, A., Kanhoush, R., Magre, S., Boizet-Bonhoure, B., & Penrad-Mobayed, M. (2008). Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Developmental Dynamics*, 237, 2996–3005. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21692>
- Forbes, T. R. (1940). Studies on the reproductive system of the alligator IV. Observations on the development of the gonad, the adrenal cortex and the Müllerian duct. *Contributions to Embryology*, 28, 129–156.
- França, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C., & Griswold, M. D. (2016). The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4, 189–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., & Noce, T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 12258–12262. PMID: PMC45416
- Graham, A. (1968). *The Lake Rudolf crocodile* (*Crocodylus niloticus* Laurenti) population. Unpublished M.Sc. Thesis, University College, Nairobi, Kenya.
- Gribbins, K. M., Siegel, D. S., Anzalone, M. L., Jackson, D. P., Venable, K. J., Rheubert, J. L., & Elsey, R. M. (2010). Ultrastructure of spermiogenesis in the American alligator, *Alligator mississippiensis* (Reptilia, Crocodylia, Alligatoridae). *Journal of Morphology*, 271, 1260–1271. <https://doi.org/10.1002/jmor.10872>
- Guerrero-Estévez, S., & Moreno-Mendoza, N. (2012). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *Journal of Fish Biology*, 80, 572–594. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03196.x>
- Harley, V. R., Clarkson M. J., & Argentaro, A. (2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocrine Reviews*, 24, 466–487. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0025>
- Janes, D. E., Elsey, R. M., Langan, E. M., Valenzuela, N., & Edwards, S. V. (2013). Sex-biased expression of sex-differentiating genes FOXL2 and FGF9 in American alligators, *Alligator mississippiensis*. *Sexual Development*, 7, 253–260. <https://doi.org/10.1159/000350787>
- Joanen, T., & McNease, L. (1980). Reproductive biology of the American alligator in southwest Louisiana. In J. B. Murphy & J. T. Collins (Eds.), *Reproductive Biology and Diseases of Captive Reptiles* (pp. 153–159). Contr. Herp. No. 1). Lawrence, Kansas: Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Juhász, T., Matta, C., Somogyi, C., Katona, É., Takács, R., Soha, R. F., ... Zákány, R. (2014). Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal*, 26, 468–482. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.001>
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137–138.
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., & y Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, 122, 2813–2822.
- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K., & Furusawa, M. (1994). Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 162, 354–363. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1093>
- Lance, V. A. (1989). Reproductive cycle of the American alligator. *American Zoologist*, 29, 999–1018.
- Levy, H., Deane, H. W., & Rubin, B. L. (1959). Visualization of steroid 3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 65, 933–943. <https://doi.org/10.1210/endo-65-6-932>
- Mizrak, S. C., Gadella, B. M., Erdost, H., Ozer, A., Van Pelt, A. M. M., & Van Dissel-Emiliani, F. M. F. (2008). Spermatogonial stem cell sensitivity to capsaicin: An in vitro study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 52, 1477–7827. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-52>
- Moore, B. C., Hamlin, H. J., Botteri, N. L., Lawler, A. N., Mathavan, K. K., & Guillet, L. J. Jr. (2010). Posthatching development of *Alligator mississippiensis* ovary and testis. *Journal of Morphology*, 271, 580–595. <https://doi.org/10.1002/jmor.10818>
- 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 genes in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics*, 14, 62–68.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V. R., & Merchant-Larios, H. (1999). Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures. *Journal of Experimental Zoology*, 284, 705–710. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19991101\)284:6<705::AID-JEZ12>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19991101)284:6<705::AID-JEZ12>3.0.CO;2-1)
- Moreno-Mendoza, N., Torres-Maldonado, L., Chimal-Monroy, J., & Merchant-Larios, H. (2004). Disturbed expression of Sox9 in pre-Sertoli cells underlies sex-reversal in mice B6.Ytir. *Biology of Reproduction*, 70, 114–122.
- Muramatsu, S., Wakabayashi, M., Ohno, T., Amano, K., Ooishi, R., Sugahara, T., ... Matsuda, A. (2007). Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 32158–32167. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706158200>
- Nagai, K. (2001). Molecular evolution of Sry and Sox gene. *Gene*, 270, 161–169. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00479-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00479-6)
- Nagai, K., Saitoh, Y., Saito, S., & Tsutsumi, K. (2012). Structure and hibernation-associated expression of the transient receptor potential vanilloid 4 channel (TRPV4) mRNA in the Japanese grass lizard (*Takydromus tachydromoides*). *Zoological Science*, 29, 185–190. <https://doi.org/10.2108/zsj.29.185>
- Notarnicola, C., Malki, S., Berta, P., Poulat, F., & Boizet-Bonhoure, B. (2006). Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene Expression Patterns*, 6, 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.01.001>
- Platt, S. G., Rainwater, T. R., Thorbjarnarson, J. B., & McMurry, S. T. (2008). Reproductive dynamics of a tropical freshwater crocodilian: Morelet's crocodile in northern Belize. *Journal of Zoology*, 275, 177–189. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00426.x>
- Qin, Y., & Bishop, C. E. (2005). Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Human Molecular Genetics*, 14, 1221–1229. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi133>
- Seydoux, G., & Strome, S. (1999). Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: Regulation of gene expression in early germ cells. *Development*, 126, 3275–3283. PMID: 10393107
- She, Z. Y., & Yang, W. X. (2014). Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53, R21–37. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0018>
- Shoemaker-Daly, C. M., Jackson, K., Yatsu, R., Matsumoto, Y., & Crews, D. (2010). Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads. *Developmental Dynamics*, 239, 1061–1075. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22266>
- Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A. C., & Treier, M. (2004). The murine Winged-Helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131, 933–942. <https://doi.org/10.1242/dev.00969>
- Smith, C. A., & Joss, M. P. (1994). Gonadal sex differentiation in *Alligator mississippiensis*, a species with temperature-dependent sex determination. *Cell and Tissue Research*, 273, 149–162. <https://doi.org/10.1007/BF00304622>

- Soullier, S., Jay, P., Poulat, F., Vanacker, J. M., Berta, P., & Laudet, V. (1999). Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. *Journal of Molecular Evolution*, *48*, 517–527. <https://doi.org/10.1007/PL00006495>
- Spotila, L. D., Spotila, J. R., & Hall, S. E. (1998). Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Journal Experimental Zoology*, *281*, 417–427. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<417::AID-JEZ7>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<417::AID-JEZ7>3.0.CO;2-R)
- Tanaka, S. S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., ... Noce, T. (2000). The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes and Development*, *14*, 841–853. <https://doi.org/10.1101/gad.14.7.841>
- Teilmann, S. C., Byskov, A. G., Pedersen, P. A., Wheatley, D. N., Pazour, G. J., & Christensen, S. T. (2005). Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Molecular Reproduction and Development*, *71*, 444–452. <https://doi.org/10.1002/mrd.20312>
- Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., ... Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, *139*, 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>
- Uribe, M. C., & Guillelte, L. J. Jr. (2000). Oogenesis and ovarian histology of the American Alligator: *Alligator mississippiensis*. *Journal of Morphology*, *245*, 225–240. [https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200009\)245:3<225:AID-JMOR4>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200009)245:3<225:AID-JMOR4>3.0.CO;2-M)
- Wen, Q., Cheng, C. Y., & Liu, Y. X. (2016). Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *S1084-9521*, 30067–30072. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.003>
- Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J. A., & Sinclair, A. H. (1999). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Developmental Dynamics*, *216*, 411–419. Retrieved from [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199912\)216:4/5<411::AID-DVDY9>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199912)216:4/5<411::AID-DVDY9>3.0.CO;2-Y)
- Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R. H., Ogino, Y., ... Iguchi, T. (2015). TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. *Scientific Reports*, *18*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep18581>
- Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Parrot, B., Yamaguchi, K., Ogino, Y., ... Iguchi, T. (2016). RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during Alligator mississippiensis temperature-dependent sex determination and differentiation. *BMC Genomics*, *17*, 77. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2396-9>
- Ye, J. (2012). Primer BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *134*, 1471–2105. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

How to cite this article: Martínez-Juárez A, López-Luna MA, Porras-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. Expression of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*. 2018;330:148–164. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22799>